

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**LABORATÓRIO DE ENGENHARIA BIOQUÍMICA**  
**AREA DE CONCENTRAÇÃO: DEPARTAMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS**

**Modificação de Quitina e Quitosana por via  
Enzimática**

**Lisanne Beatriz Grigolon**  
**Engenheira Química – UNICAMP**

**Prof. Dra. Telma Teixeira Franco**  
**Orientadora**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química  
como parte dos quesitos necessários para obtenção do Título de Mestre em  
Engenharia Química.

**Campinas, 18 de junho de 2001.**

UNICAMP BIBLIOTECA CENTRA SEÇÃO CIRCULANTE
--

UNIDADE BC  
Nº CHAMADA T/UNICAMP  
G 877m  
V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMBO BC/ 51511  
PROC 16.837102  
C \_\_\_\_\_ D X \_\_\_\_\_  
PREÇO R\$ 11,00  
DATA 13/11/02  
Nº CPD \_\_\_\_\_

CM00176585-8

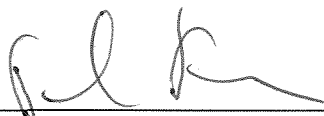
313 10 267669

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE – UNICAMP

G877m	<p>Grigolon, Lisanne Beatriz</p> <p>Modificação de quitina e quitosana por via enzimática./ Lisanne Beatriz Grigolon. --Campinas, SP: [s.n.], 2001.</p> <p>Orientador: Telma Teixeira Franco.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.</p> <p>1. Bioreatores. 2. Quitina. 3. Quitosana. 4. Hidrólise. 5. Enzimas imobilizadas. I. Franco, Telma Teixeira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.</p>
-------	---

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Dissertação de Mestrado defendida por Lisanne Beatriz Grigolon e aprovada em 18 de junho de 2001 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



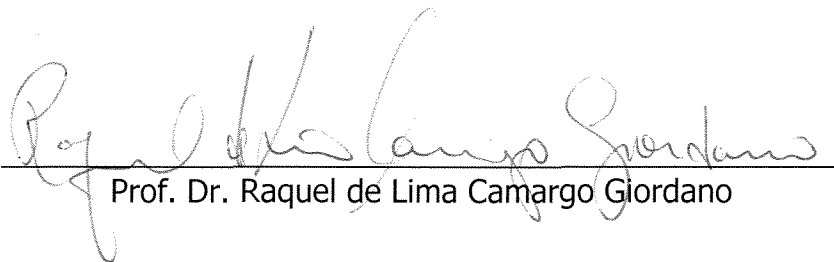
---

Prof. Dr. Telma Teixeira Franco - Orientadora



---

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho



---

Prof. Dr. Raquel de Lima Camargo Giordano



---

Dra. Eliana Setsuko Kamimura

100254/591

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida em 18/06/01 e aprovada pela Comissão Julgadora.

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, cursive letters, positioned above a horizontal line.

Profa. Dra. Telma Teixeira Franco

*À Lisete, pelo exemplo de mãe e mulher.*  
*Aos meus irmãos (Carlos e Anna), pela união e o apoio.*  
*À Prof. Telma, pela oportunidade de crescimento.*

## *DESCOBRIMENTO*

*Abancado à escrivaninha em São Paulo  
Na minha casa da rua Lopes Chaves  
De supetão senti um friúme por dentro.  
Fiquei trêmulo, muito comovido  
Com o livro palerma olhando pra mim.*

*Não vê que me lembrei que lá no Norte, meu Deus!  
não muito longe de mim  
Na escuridão ativa da noite que caiu  
Um homem pálido magro de cabelo escorrendo nos olhos,  
Depois de fazer uma pele com a borracha do dia,  
Faz pouco se deitou, está dormindo.*

*Esse homem é brasileiro que nem eu.*

Mario de Andrade

# AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Telma Franco, excelente e exigente orientadora, e que sempre se mostrou disposta a fazer com que seus “filhos” de laboratório fossem em frente. Muito obrigada.

Ao pessoal da Waters Comercial, Barsotti, Alexandre, Renato Dias, Edson e Carl Bergquist, pela presteza e pela elucidação das dúvidas nas técnicas de GPC.

Aos meus queridos colegas de laboratório que sempre me ajudaram e tiveram a paciência de aturar o meu gênio. Vou sentir saudades do ambiente agradável do LEB.

- Ana Paula, pela produção da quitinase usada neste trabalho;
- Kathia, pelas gargalhadas;
- Chico (que sempre teve a maior paciência para nos ajudar a produzir a quitosanase),
- Sueli e ao Fabiano, nossos vizinhos, pela força quando não sobravam computadores;
- Aos alunos de I.C. Jonatas, Aline e Ricardo;
- Everaldo, à Luciana, à Eliana (pela calorosa ‘Terapia de Grupo’) e aos ingressantes Joseane e Zoran.

Aos novos amigos Tedra, Ricardo, Luciana, Adriana, Bárbara, Débora e Wilza.

Ao Érico, pelos anos de convivência e pela amizade mais do que sincera.

Aos meus grandes amigos e quase irmãos Max e Bella, pessoas pelas quais tenho o maior apreço e faço questão que permaneçam em minha vida por longos anos.

Ao Marcelo Lancellotti, biólogo inveterado e amigo, que me ajudou a galgar os primeiros passos em microbiologia.

Aos funcionários da FEQ, Valmir, Sr. Levi, Sr. Alexandre e Rosa.

À Adriana Pagani, pelas caracterizações da área superficial.

Aos amigos de mestrado (Layse, Lucilene, Édler, Baiano e Rubão), aos amigos cantores (Traudi, Camile, Chris Bottura, Andréa e André) e aos grandes amigos Fernando (o Volta), Kelerson (o Keké), Dani Paiva, Milton e Rogers, pela maravilhosa convivência e por terem feito destes anos inesquecíveis.

A quitosana é um polímero catiônico bioadesivo, biocompatível e biodegradável, e estas propriedades fazem da quitosana um material atrativo para inúmeras aplicações no campo biotecnológico e farmacêutico. O escopo do presente trabalho se insere na investigação da modificação enzimática da quitosana, visando produção de polímeros de baixa massa molar e quitoooligômeros utilizando papaína livre e imobilizada.

Quitina foi utilizada como suporte para imobilização da papaína, sendo o glutaraldeído utilizado como agente reticulante. A análise da superfície do suporte foi executada, e os dados sugerem que a papaína se distribui tanto na superfície como nos poros da matéria fibrosa.

Os experimentos de hidrólise foram conduzidos em reator batelada em diferentes condições de pH e temperatura na presença de papaína livre e imobilizada. Em termos da produção de polímeros de menor massa molar, enzima imobilizada apresentou maior atividade nas condições de pH 3,2 e temperatura 50°C, enquanto a enzima na forma livre apresentou maior atividade a pH 5,3 e 54°C. Os perfis cromatográficos obtidos por cromatografia de permeação em gel (CPG) foram progressivamente alterados pela ação enzimática, apresentando um shift para a região de menor grau de polimerização (GP).



Chitosan is a cationic biopolymer that is bioadhesive, biocompatible and biodegradable, and these unique properties makes it an attractive material for numerous potential applications in biotechnological and pharmacological fields. The scope of this work is to investigate enzymatic modification of chitosan in order to produce low molar mass polymers and chitooligomers with the aid of free and immobilised papain.

Papain was immobilised onto chitin fibers, with glutaraldehyde as cross-linking agent. Surface area analysis of chitin was performed, and data suggests that papain is covalently bound to chitin both at the surface and into the pores of the fiber.

Hydrolysis experiments were performed in a batch reactor at different pH and temperature conditions with 1% chitosan – lactic acid solutions in the presence of free and immobilised papain. Immobilised enzymes showed higher activity at pH 3,2 and 50°C, whereas free form showed higher activity at pH 5,3 and 54°C in terms of polymer modification. Chromatographic profiles are progressively altered by papain-promoted hydrolysis both for free and immobilised form and showed a shift towards the region of lower degrees of polymerisation (DP).

Capítulo 1 – Introdução.....	1
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica.....	2
2.1 - Quitina.....	2
2.2 - Quitosana .....	2
2.3 – Derivados de quitina e quitosana.....	3
2.3.1 – Hidrólise química.....	5
2.3.2 – Hidrólise enzimática – quitinases e quitosanases.....	6
2.3.3 – Hidrólise enzimática – outras enzimas .....	7
2.3.4 – Papaína .....	9
2.4 – Imobilização de enzimas.....	9
2.5 – Quitina como suporte de imobilização de enzimas.....	12
2.6 – Cromatografia de permeação em gel de alta eficiência [CPGAE] .....	14
2.6.1 – Relacionamento entre massa molecular e volume de eluição.....	14
2.6.2 – Determinação da distribuição de massas molares – Curva cumulativa .....	16
2.6.3 – Aplicação da CPGAE em determinação de massas molares de soluções de quitosana.....	17
Capítulo 3 - Materiais e métodos .....	19
3.1 – Preparação e caracterização dos substratos.....	19
3.2 – Imobilização de papaína em quitina .....	19
3.3 –Caracterização do suporte para imobilização.....	20
3.3.1 – Classificação granulométrica .....	20
3.3.2 – Análise da área superficial da quitina.....	20
3.3.3 –Microscopia eletrônica de varredura .....	20
3.4 – Hidrólise da quitosana por papaína livre e imobilizada .....	21
3.5 – Hidrólise de quitina coloidal pela enzima quitinase fúngica.....	21
3.6 – Análise viscosimétrica da mistura reacional.....	22
3.7 – Análise das amostras por CPGAE .....	22
3.7.1 – Preparo das amostras .....	22
3.7.2 – Preparo dos padrões.....	23
3.7.3 – Condições analíticas.....	23
3.7.4 – Análise dos resultados.....	23
3.8 – Análise das amostras por CLAE.....	25

3.8.1 – Preparo dos padrões de oligômeros de quitosana.....	25
3.8.2 – Preparo dos padrões acetilados .....	25
3.8.3 – Condições analíticas.....	25
3.9 – Determinação de Proteínas – SEDMAK & GROSSBERG 1977.....	25
3.9.1 – Preparação do Corante.....	26
3.9.2 – Construção da Curva Padrão de Albumina de soro bovino (BSA) .....	26
3.9.3 – Dosagem de proteínas em amostras .....	26
<b>Capítulo 4 - Modificação Enzimática do Polímero Quitosana .....</b>	<b>27</b>
4.1 – Grau de acetilação da Quitosana .....	27
4.2 - Distribuição de massas molares - Quitosana.....	29
4.3 – Efeito das condições de reação na atividade catalítica .....	31
4.3.1 – Condição 1: pH 3,2 T=50°C.....	33
4.3.2 – Condição 2: pH 4,3, T=54°C.....	38
4.3.3 – Condição 3: pH 5,3, T=54°C.....	42
4.4– Acompanhamento prolongado da melhor condição imobilizada.....	47
4.5 – Teste de reaproveitamento do catalisador .....	51
<b>Capítulo 5 - Produção de Oligossacarídeos .....</b>	<b>54</b>
5.1 – Produção de oligossacarídeos de quitosana .....	54
5.2 – Produção de oligossacarídeos de quitina .....	55
<b>Capítulo 6 - Imobilização da papaína .....</b>	<b>56</b>
6.1 – Efeito da carga enzimática na atividade catalítica .....	56
6.2 – Caracterização das superfícies – Fisissorção.....	57
6.3 – Análise superficial do suporte – MEV .....	59
6.4 – Efeitos da Transferência de Massa no sistema reacional .....	61
6.5 – Hipóteses sobre a Transferência de Massa no sistema reacional .....	62
<b>Capítulo 7 - Conclusões .....</b>	<b>67</b>
<b>Capítulo 8 - Sugestões para trabalhos futuros .....</b>	<b>68</b>
<b>Capítulo 9 -Referências Bibliográficas.....</b>	<b>69</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>76</b>

$\nu$  – COEFICIENTE ESTEQUIOMÉTRICO (-)

**BSA** – ALBUMINA DE SORO BOVINO

$\bar{c}$  – CONCENTRAÇÃO MÉDIA ( $\text{mol.m}^{-3}$ )

**CLAE** – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

**CPGAE** – CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL DE ALTA EFICIÊNCIA

**EDTA**- ETILENODIAMINA TETRAACETATO (sódico)

**GA** – GRAU DE ACETILAÇÃO

**GD** – GRAU DE DESACETILAÇÃO

**GlcNAc** –  $\beta$  (1-4) N-ACETIL –D – GLICOSAMINA

**GlcNH<sub>2</sub>** – D – GLICOSAMINA

**k<sub>ij</sub>** – COEFICIENTE DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA DE I EM RELAÇÃO A J ( $\text{m.s}^{-1}$ )

**k<sub>i,M</sub>** – COEFICIENTE DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA DE I EM RELAÇÃO A MEMBRANA ( $\text{m.s}^{-1}$ )

**MEV** – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

**M<sub>n</sub>** – MASSA MOLAR MÉDIA NUMÉRICA ( $\text{g.MOL}^{-1}$ )

**M<sub>p</sub>** – MASSA MOLAR MÉDIA NO PICO – CPGAE ( $\text{g.MOL}^{-1}$ )

**M<sub>w</sub>** – MASSA MOLAR MÉDIA PONDERAL ( $\text{g.MOL}^{-1}$ )

**M<sub>z</sub>** – MASSA MOLAR MÉDIA DISTRIBUIÇÃO Z ( $\text{g.MOL}^{-1}$ )

**M<sub>z+1</sub>** – MASSA MOLAR MÉDIA DISTRIBUIÇÃO Z+1 ( $\text{g.MOL}^{-1}$ )

**N<sub>i</sub>** – FLUXO MÁSSICO DE i EM RESPEITO A INTERFACE ( $\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ )

**PD** – POLIDISPERSÃO

$\bar{x}$  – FRAÇÃO MOLAR MÉDIA (-)

**CAPÍTULO 1****INTRODUÇÃO**

Polímeros são uma classe promissora de biomateriais, sendo extensivamente aplicados na medicina e biotecnologia, assim como na indústria de cosméticos e alimentícia. Estes materiais podem ser selecionados e modificados (química ou enzimaticamente) de acordo com suas características-chave, como resistência mecânica, degradabilidade, permeabilidade e solubilidade. As aplicações para estes materiais incluem aparatos cirúrgicos, como próteses, órgãos artificiais e suturas; sistemas de liberação controlada de drogas com diferentes rotas de administração, suportes de enzimas imobilizadas e células, biossensores, bioadesivos e materiais para aplicações ortopédicas.

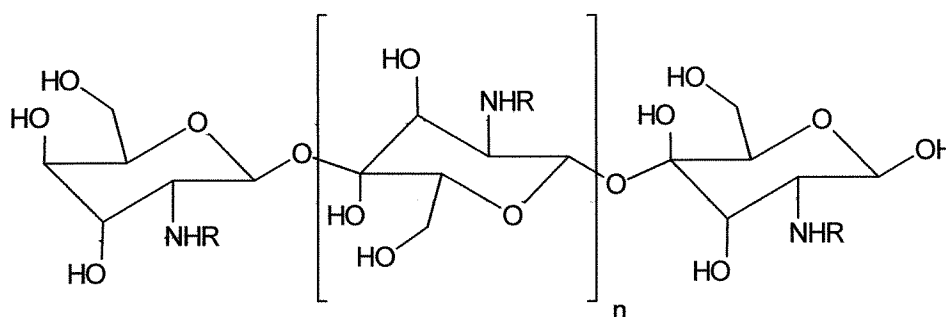
Materiais poliméricos podem ocorrer naturalmente, ser sintetizados ou serem uma combinação dos dois efeitos. Biopolímeros de procedência natural são abundantes e usualmente são biodegradáveis. A principal desvantagem destes produtos reside na dificuldade de se desenvolver métodos de produção reprodutíveis, devido a complexidade estrutural que varia de acordo com a procedência. Nesta classe de materiais reside a quitina, que é derivada da biomassa de crustáceos e frutos do mar, e a quitosana, que é obtida pela desacetilação química da quitina, mas que também pode ocorrer naturalmente.

Quitosana e seus derivados são conhecidos por sua excelente biocompatibilidade e não toxicidade. Tem como principais potencialidades a formação de filmes e membranas, sendo largamente utilizados em sistemas de liberação de drogas. Os oligômeros de quitosana (cujo grau de polimerização é menor que 20) agregam potencialidades farmacêuticas e alimentícias.

Este trabalho tem por objetivo a modificação enzimática do polímeros quitina e quitosana pelo emprego de quitina de *Trichoderma spp.* e papaína imobilizada, respectivamente. Desta forma, o trabalho se insere no estudo de novas aplicações para as enzimas imobilizadas, bem como na biotransformação de um recurso renovável em produtos de grande valor agregado.

## 2.1 – Quitina

A quitina é um polímero linear  $\beta(1,4)$ -N-acetilglicosamina (GlcNAc) de alta massa molar. É um polissacarídeo estrutural, sendo o principal constituinte do exoesqueleto de crustáceos e artrópodes e da parede celular de fungos e plantas.



**Figura 2.1** – Estrutura dos polímeros quitina (R=Ac) e quitosana (R=H, 100% desacetilada).

Depois da celulose, a quitina é o material renovável mais abundante na natureza. No entanto, aproximadamente 75% do peso total de crustáceos e frutos do mar é considerado resíduo, enquanto 20 - 58% do peso seco deste é representado pela quitina, dependendo das condições de processamento [CHEN & LEE, 1995]. Há, portanto, a necessidade de se utilizar este potencial renovável de forma a obter produtos de maior valor agregado.

## 2.2 - Quitosana

A quitosana é um dos numerosos derivados da quitina. Sua estrutura difere da matéria-prima por ser total ou parcialmente desacetilada, constituída de grupos D-glicosamina (GlcN) e GlcNAc, o que confere a este polímero maior solubilidade comparado a quitina.

A quitosana é produzida a partir da quitina através de um tratamento químico por hidrólise alcalina e também pela ação de enzimas que promovem a desacetilação de

quitinas, as quitinas desacetilases [TSIGOS *et al.*, 2000]. Em geral, as quitosanas comerciais são materiais disponíveis com uma ampla faixa de massas molares, tipicamente entre 50 a 2000 KDa, para as quais o grau de desacetilação (GD) situa entre 60 a 90% [REGE & BLOCK, 1999]. Sua denominação não identifica um único composto, mas uma família de compostos, cada um diferindo no grau de acetilação, tipo de sequência, comprimento de cadeia e distribuição de massas molares.

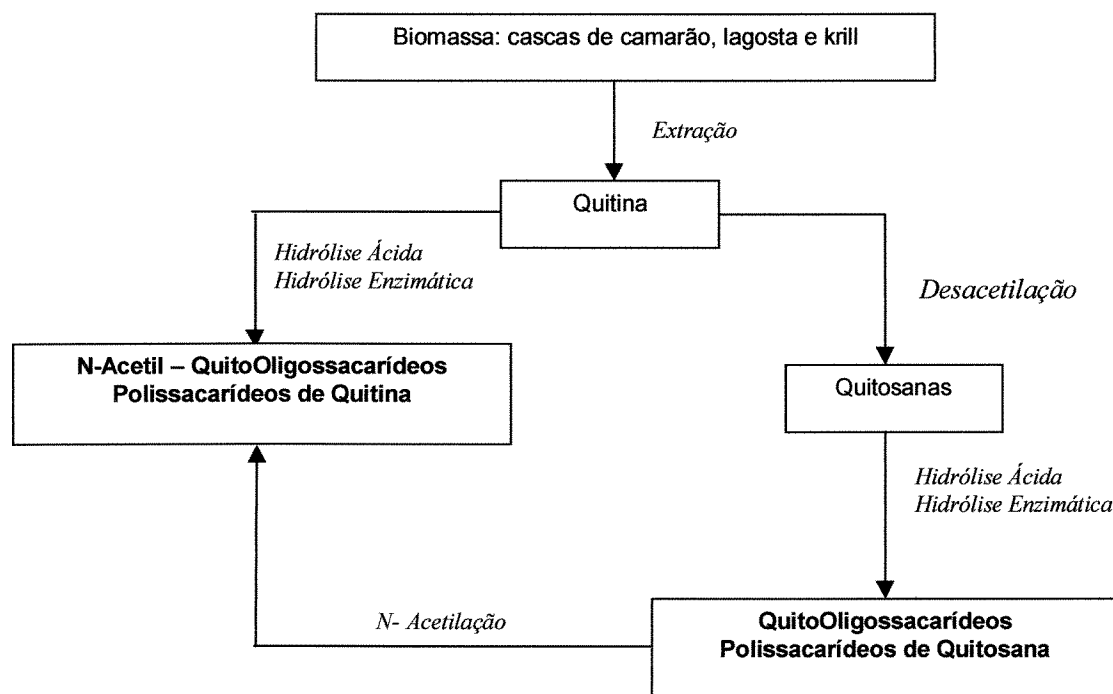
Em soluções ácidas a quitosana comporta-se como um polieletrólito e interage fortemente com proteínas e polissacarídeos aniônicos, devido à alta densidade dos grupos aaminados presentes no polímero [MUZZARELLI *et al.*, 1987].

### 2.3 – Derivados de quitina e quitosana

Os polímeros nativos ou quimicamente modificados combinam características físico-químicas significativas e convenientes, proporcionando larga atuação no campo biotecnológico como suportes para liberação controlada de drogas [ŞENEL *et al.*, 2000, RUEL-GARIÉPY *et al.*, 2000, KUMAR *et al.*, 2000, HE *et al.*, 1999], como material estrutural em engenharia de tecidos [CHUPA *et al.*, 2000, KATO *et al.*, 2000] e no tratamento de efluentes fenólicos [IKEHATA *et al.*, 2000]. Biodegradabilidade *in-vivo* [ONISHI *et al.*, 1999], biocompatibilidade [DODANE *et al.*, 1999], ação antimicrobiana [REDDY *et al.*, 2000], cicatrizante também são propriedades destes polímeros, que se comportam como fontes de liberação controlada de glicosaminas [ZHANG &HIRANO, 1995].

Os oligômeros de quitosana e de quitina (de 1 a 10 unidades monoméricas) possuem grande diversidade de efeitos farmacológicos, devido à facilidade de penetração nas células. Efeitos antitumorais foram descritos na literatura, em particular para os derivados com estrutura hexa-N-acetilquitohexose. Além do retardo no crescimento do tumor, foi observado o efeito antimetastático contra carcinomas de pulmão tipo Lewis, promovendo a inibição em 50% quando administrado por via intravenosa. A administração destes compostos também protege os animais portadores de tumores contra infecções microbianas de *Listeria monocytogenes* e *Candida albicans*. A hexa-N-acetilquitohexose não demonstrou nenhuma atividade tóxica aguda, mutagênica ou de pirogenicidade até concentração de 100 mg/Kg de peso corporal [MUZZARELLI, 1993; MUZZARELLI *ET AL.*, 1994].

Com a emergência do potencial biomédico e aplicações alimentícias e cosméticas da quitosana e quitoooligossacarídeos, processos viáveis de transformações da quitina foram desenvolvidos.



**Figura 2.2** – Biotransformações de Quitina e Quitosana.

A Tabela 2.1 resume os principais efeitos farmacológicos citados quando da administração de quitoooligossacarídeos.

**Tabela 2.1**– Efeitos farmacológicos observados. \*citados por OLSEN *et al*, 1988.

Efeito Farmacológico descrito	Referência
Ativação de células de exudato pelos oligômeros com 4 açúcares, no mínimo e máximo 5 ou 6 açúcares aminados.	SUZUKI <i>et al</i> . [1985]*
Inibição da atividade hidrolítica da trombina por heparinóides de quitina.	NISHIMURA <i>et al</i> , [1986]
Ativação da defesa do organismo; prevenção contra infecções microbianas.	NISHIMURA <i>et al</i> . [1984]*
Ativação de células polimorfonucleadas em cães.	USAMI <i>et al</i> , [1997]
Inibição de tumores e infecções microbianas em animais portadores de tumores.	MUZZARELLI <i>et al</i> , [1994] e MUZZARELLI, [1993]



Os oligossacarídeos de quitina e quitosana podem ser obtidos através da despolimerização da cadeia polimérica pela clivagem das ligações  $\beta$ -(1-4)-glicosídicas. A hidrólise pode ser obtida pelo uso de ácidos inorgânicos (Hidrólise química) ou pela utilização de enzimas hidrolíticas, específicas ou não específicas (Hidrólise enzimática).

### 2.3.1 – Hidrólise química

A produção de oligossacarídeos da quitosana com ácido inorgânico concentrado foi descrita por HORQWITZ *et al.* [1957]. Neste estudo pioneiro, a quitosana foi hidrolisada com HCl 35% a 53°C e 8h de reação, gerando oligossacarídeos com grau de polimerização (GP) de 1 a 5 unidades monoméricas.

RUPLEY [1964] em um estudo sobre a produção de oligômeros de quitina descreveu que a reação com HCl concentrado, a temperatura de 40°C e 20h de reação promoveram a condição ótima para a produção de oligômeros de 1 a 6 unidades detectáveis.

LEE *et al.* [1999] descreveram um estudo sobre a produção de oligômeros de quitosana utilizando ácido concentrado (HCl 35%) a 80°C e 2h de reação seguido de precipitação a baixas temperaturas, utilizando metanol para promover a precipitação dos oligômeros. Obteve-se por este método oligômeros de GP 1 – 7 no material precipitado, com preponderância de pentâmeros e hexâmeros, com rendimento total de 70% em massa; entretanto, a adição de metanol proporcionou também a precipitação de oligômeros menores (GP 1 – 4).

Outros ácidos inorgânicos foram utilizados para a produção de oligossacarídeos. Foram descritos na literatura a utilização de ácido fluorídrico [BOSSO *et al.*, 1986] e ácido fosfórico [HASEGAWA *et al.*, 1993].

Em contraste com a hidrólise ácida, a hidrólise enzimática da quitina e quitosana por quitinases e quitosanases permite a produção de diferentes oligômeros. Por serem específicas, há uma maior possibilidade de controle das variáveis de produção quando comparadas com hidrólises químicas.

### 2.3.2 – Hidrólise enzimática – quitinases e quitosanases

Quitinases (3.2.1.14) e quitosanases (3.2.1.132) pertencem ao grupo das hidrolases, atuantes sobre a ligação  $\beta$ -(1-4)-glicosídica dos polímeros, originando oligossacarídeos de menor massa molar [DIXON & WEBB, 1979].

O complexo de enzimas quitinolíticas pode ser observado em microorganismos marinhos e terrestres, plantas e animais. A produção, isolamento e caracterização de enzimas quitosanólíticas foi observada na literatura para cepas de *Streptomyces sp.* [BOUCHER *et al.*, 1992], *Penicillium islandicum* [FENTON & EVELEIGH, 1981], *Bacillus megaterium* [PELLETIER & SYGUSH, 1990] e *Bacillus cereus* [PIZA *et al.*, 1999].

As enzimas quitinolíticas são geralmente induzidas como um complexo enzimático e são divididas em duas classes principais [SHAIKH *et al.*, 1993]:

- (1) Endo - enzimas, sendo neste caso a quitinase e quitosanase;
- (2) Exo - enzimas, envolvendo as enzimas  $\beta$ -N-acetil - D - glicosaminidase ( $\beta$ NAGase) (3.2.1.30),  $\alpha$ -N-acetil - D - glicosaminidase (3.2.1.50) e  $\beta$ -N-acetil - D - hexosaminidase (3.2.1.52).

No primeiro tipo de degradação, as endoenzimas catalisam a clivagem da ligação o-glicosídica dos polímeros, originando oligômeros de menor massa molar [PELLETIER & SYGUSH, 1990]. Segundo DIXON & WEBB [1979], a ação individual e prolongada das endoenzimas não promove a produção de monômeros. O segundo tipo de degradação proporciona a hidrólise dos oligômeros formando os monômeros.

AIBA [1994], no estudo da hidrólise da quitosana por endoquitinases comerciais de *Bacillus sp* PI-7S e *Streptomyces griseus*, obteve oligossacarídeos com GP 2 - 5, e lançou a hipótese que as quitinases poderiam reconhecer o resíduo GlcNAc em quitosanas parcialmente acetiladas, clivando o polímeros nestes *loci*.

STOYACHENKO *et al.* [1994] observaram duas quitinases no sobrenadante de cultura de *Streptomyces kursanovii*, nomeadas Chi26 e Chi42. As duas enzimas hidrolisaram a quitina, a quitosana (GD 85%) e Carboximetil-quitina (CM-quitina, 69% substituída) por clivagem endoglicolítica, hidrolisaram tetrâmeros e pentâmeros de NAG, e trímeros, mais lentamente. O estudo de CLAE dos produtos de hidrólise indicou que a enzima Chi42 atuou também na catálise da reação de transglicosilação, visto que foram detectados oligômeros de maior GP do que os substratos iniciais.

Segundo IZUME *et al.* [1987], a quitosanase de *Bacillus sp.* n° 7-M promove a hidrólise de quitosanas (GD 99%), produzindo quitoooligômeros com GP 2 – 6, sugerindo a ação endoglicolítica da enzima. A análise dos grupos redutores gerados pela clivagem evidenciou a especificidade de clivagem entre as ligações GlcN-GlcN do polímero.

FENTON & EVELEIGH [1981] relataram que o ataque hidrolítico da quitosanase de *Penicillium islandicum* sobre quitosanas com GA 30 – 60% promove a formação de heterooligômeros de 2 – 3 unidades, e não houve atividade da enzima contra a quitina, sugerindo que o ataque enzimático ocorre entre ligações GlcN – GlcNAc do polímero.

### 2.3.3 – Hidrólise enzimática – outras enzimas

A ação hidrolítica não específica frente a quitosana tem sido extensivamente descrita na literatura como uma alternativa efetiva com respeito a obtenção de oligossacarídeos e de polímeros de menor massa molar e, ao mesmo tempo, de custo relativo baixo em comparação às enzimas específicas. Foi evidenciada a atividade hidrolítica sobre quitina e quitosana para as enzimas papaína (de origem vegetal), lipase, celulase, pectinase, glucanase e protease (de origem microbiana). [PANTALEONE *et al.*, 1992, MUZZARELLI *et al.*, 1994; MUZZARELLI *et al.*, 1995; IZUME *et al.*, 1992].

De acordo com MUZZARELLI *et al.* [1994], a atividade da papaína sobre o lactato de quitosana a 50°C e pH ácido promoveu o decréscimo de 94% da viscosidade da solução quando comparada à viscosidade do controle, sugerindo a clivagem do polímero em frações poliméricas menores. Não foi descrita na literatura a potencialidade da papaína no sentido da produção de quitoooligômeros.

TERBOJEVICH *et al.* [1996] indicaram que a ruptura polimérica no sistema descrito anteriormente acontece entre ligações heterogêneas do tipo GlcNAc-GlcNH<sub>2</sub>, denotando uma forma de ataque seletivo à cadeia polimérica. Suporte à essa hipótese advém da indiferença da papaína frente à quitina, material no qual a papaína pode ser imobilizada [FINLEY *et al.*, 1977] e pela indiferença também frente a quitosanas totalmente desacetiladas [YALPANI & PANTALEONE, 1994].

KURITA *et al.* [2000] apresentaram potencialidade da lisozima para a degradação de quitinas e quitosanas. O ataque enzimático de quitinas desacetiladas teve maior efetividade (em termos do n° de unidades redutoras) para quitinas com GA 0,43,

apresentando baixa atividade para quitinas (GA 0,89) e quitosanas (GA 0,03).

VÅRUM *et al.* [1996], em um estudo de RMN<sup>13</sup>C, relataram que a lisozima catalisa a hidrólise da ligação 2-acetamida-2-deoxi-D-glicosídica de quitosanas de GD 0,32, gerando novos grupos redutores e não redutores acetilados, indicando a alta especificidade das unidades acetiladas em relação aos subsítios C<sub>L</sub> e E<sub>L</sub> da lisozima. Um estudo mais detalhado da sua especificidade foi desenvolvido para a hidrólise de quitosanas com GA 0,35, mostrando que, mesmo para estas condições, mais de 90% dos grupos terminais eram acetilados [STOKKE *et al.*, 1995].

ZHANG *et al.* [1999] descreveram a degradação da quitosana via utilização de uma mistura complexa de enzimas comerciais constituída de celulase, alfa-amilase e proteinase. A taxa de decréscimo da viscosidade da solução reacional foi rápida, mas a massa molar da amostra manteve-se em torno de 10000 Da. Esses resultados sugeriram que a mistura teria potencial de hidrolisar quitosanas e obter oligômeros com grau de polimerização entre 5 e 17 unidades monoméricas.

A tabela 2.2. apresenta um quadro resumo de alguns dos trabalhos existentes na literatura sobre hidrólise inespecífica de quitinas e quitosanas.

**Tabela 2.2.** Hidrólise de quitosanas pela ação inespecífica de várias enzimas.

Enzima	Fonte	Substrato	Resultados Obtidos	Referência
Celulase	<i>Trichoderma viride</i>	Quitosana 1. [GA 0,15] 2. [GA 0,05]	1. 99% redução de viscosidade [25°C, 10 min] 2. Produção de oligômeros de 5-7 unidades	1. PANTALEONE <i>et al.</i> , 1992 2. MURAKI <i>et al.</i> , 1993.
Papaína	<i>Carica papaya</i>	Quitosana [GA 0,15]	98% redução de viscosidade [50°C, 60 min]	MUZZARELLI <i>et al.</i> , 1994.
Lisozima	Gema de Ovo	Quitosana [GA ~ 0]	Enzima indiferente ao substrato	YALPANI & PANTALEONE, 1994.
Lipase	1. Gérmen de Trigo  2. <i>Aspergillus niger</i>	Quitosana	1. 35% de redução de viscosidade [25°C, 10 min] 2. 100% de redução de viscosidade [25°C, 18 h].	1. MUZZARELLI <i>et al.</i> , 1995. 2. PANTALEONE <i>et al.</i> , 1992.

### 2.3.4 – Papaína

A papaína (3.4.4.10) é uma cisteína protease extraída do látex de frutos não maduros de *Carica papaya*. É classificada como uma hidrolase, e tem aplicação vasta na indústria de alimentos devido à sua forte ação proteolítica, tendo como principais aplicações clarificação da cerveja, o amaciamento de carnes e processamento de couro em curtumes. Na medicina experimental a papaína é aplicada intra-articulação para induzir a osteoartrite, rompendo a matriz intracelular da cartilagem, de modo que possam ser testadas drogas anti-reumáticas *in vivo*.

A papaína, na sua forma cristalina, apresenta grande estabilidade, sendo estável na faixa de temperatura de 30 a 75°C, com temperatura ótima em 60°C, e pH de estabilidade na faixa de 3,0 a 9,5 com pH ótimo em torno de 6,5. A enzima pode ser mantida em solução de NaCl a 4°C por meses sem perda de atividade detectável. A propriedade mais surpreendente desta enzima é a sua estabilidade frente a altas temperaturas e quando em contato com solventes orgânicos [ARNON, 1970].

O sítio ativo da papaína é bem conhecido, e inclui os aminoácidos histidina 159, triptofano 177 e cisteína 25. Como uma enzima sulfidrílica, a papaína necessita de um grupo sulfidrílica livre para a sua atividade catalítica. A ativação ótima da papaína ocorre pela adição simultânea de agentes redutores suaves, como a cisteína, sulfetos e cianida, e de um agente sequestrante de metais, como EDTA. Alternativamente pode ser utilizado o 2,3 – dimercaptopropanol, agente que combina as duas propriedades necessárias para a ativação da enzima [SLUYTERMAN, 1967].

Por outro lado, a papaína é reversivelmente inativada na presença do ar e de baixa concentração de cisteína no meio, tendo sua atividade restabelecida pela utilização de altas concentrações de cisteína [BLUMBERG *et al.*, 1970]. Metais pesados, como  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$  são inibidores da papaína, mas a atividade pode ser restabelecida pela adição de EDTA e cisteína.

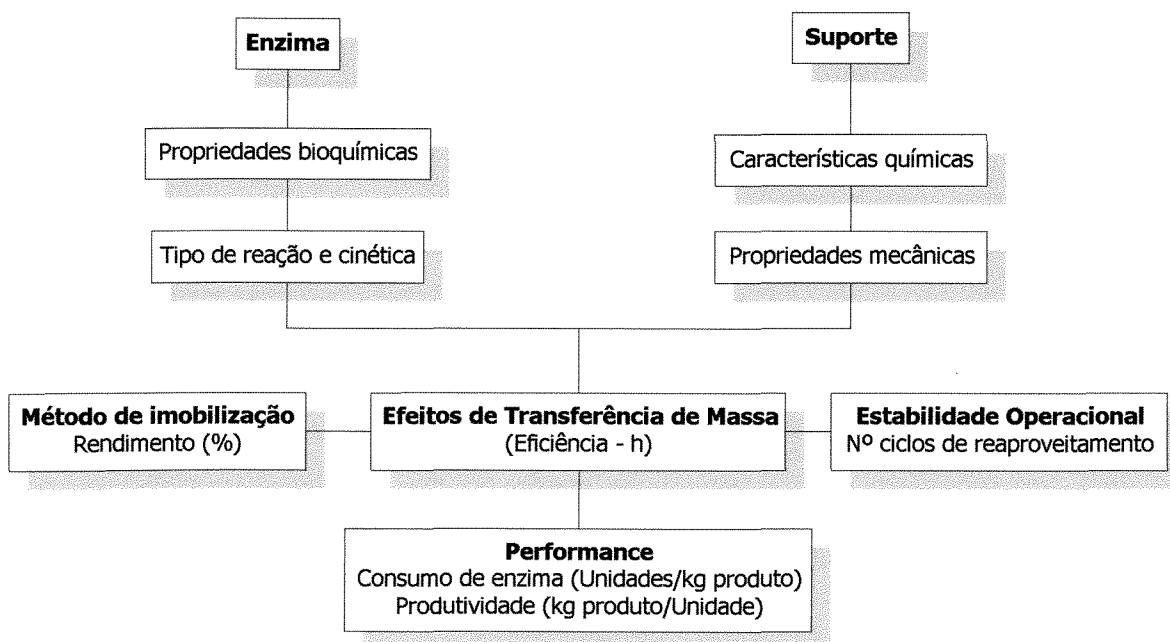
## 2.4 – Imobilização de enzimas

A grande inovação tecnológica do uso de enzimas em processos industriais advém da capacidade destas de aumentar a taxa de reação e melhorar a seletividade de um determinado processo. Uma determinada reação pode ser catalisada pela ação

enzimática com supressão parcial ou completa de reações paralelas, aumentando a produtividade do processo e também reduzindo passos adicionais de purificação pós-reação. Uma vez que as enzimas operam em condições brandas de temperatura, pressão e pH, há a possibilidade de redução de consumo de energia do processo, reduzindo os custos operacionais. Porém, o alto custo agregado para o isolamento e purificação de enzimas ainda inviabiliza o seu uso em larga escala.

A técnica de imobilização de enzimas a suportes poliméricos se apresenta como uma forma de viabilizar a utilização das enzimas em processos industriais. O termo “imobilização” não quer dizer que a enzima perde completamente sua mobilidade molecular, mas que parte desta está fixada em um suporte insolúvel [CHAPLIN & BUCKE, 1990]. É necessário que a enzima, quando imobilizada, mantenha máxima atividade catalítica, uma vez que a ligação com o suporte pode ocasionar o comprometimento do sítio ativo por ligação intra-sítio ou deformação deste, promovendo conformações não ativas.

As propriedades das enzimas imobilizadas são governadas pela interação das propriedades da enzima e do material usado como suporte para imobilização. A quantificação da performance de enzimas imobilizadas é dependente de três fatores interdependentes como apresentado na Figura 2.3.



**Figura 2.3** – Fatores primordiais a serem considerados em imobilização de enzimas. Extraído de TISHER & KASCHE, 1999.

### Método de Imobilização

Imobilização por ligação covalente pode envolver a ativação química do suporte (acoplamento de um grupo funcional reativo através de reação química) bem como o comprometimento de parte da cadeia lateral das enzimas. Neste método, as enzimas estão fortemente ligadas ao suporte e há pequena possibilidade de dissociação; entretanto apenas pequenas quantidades de enzima podem ser imobilizadas por este método (por volta de  $200\text{mg.g}^{-1}\text{matriz}$ ). Como as interações enzima/suporte são muito intensas, há a possibilidade de a enzima sofrer mudança em sua conformação espacial, ocasionando a conseqüente diminuição ou perda total da atividade enzimática.

### Efeitos de transferência de massa

Para que uma enzima, quando imobilizada, possa catalisar uma reação, os substratos devem difundir através da solução até o sítio catalítico e, no movimento contrário, os produtos devem difundir para o seio da solução. A força motriz para o processo difusivo é devido aos gradientes de concentração gerados pelo movimento dos solutos na direção da maior para menor concentração. O movimento dos solutos é descrito em termos dos seguintes passos:

- Difusão Externa – transporte de substratos e produtos está em série com a conversão catalítica;
- Difusão Interna – transporte de substratos e produtos através dos poros ocorre em paralelo com a conversão catalítica.

A modificação enzimática de macromoléculas pode ser fortemente controlada por efeitos difusionais no processo. Polímeros difundem em solução muito lentamente e, após serem catalisados pela ação de uma enzima imobilizada, os fragmentos também podem agir como substratos. Os produtos difundem pelos poros, entretanto, estes são quebrados inúmeras vezes enquanto em contato com a enzima. Este fato pode causar uma diferença significativa nos perfis de massas molares médias produzidas pelo uso de enzima livre e imobilizadas, e pode ser fomentado pelo uso de biocatalisadores porosos, onde há maior restrição à difusão interna de moléculas maiores [CHAPLIN & BUCKE, 1990]. Além disso, a determinação de constantes intrínsecas à catálise e à transferência delegam árduos esforços para se determinar, devido à complexidade tanto do sistema reacional, quanto à

presença de efeitos difusivos mistos, combinando difusão externa e interna.

### Ciclos de reaproveitamento

O fator determinante da utilização de enzimas em um processo tecnológico é o seu custo. Uma vez que são catalisadores, as enzimas não são usadas diretamente nos processos em que são envolvidas. Sua produtividade está relacionada, assim como catalisadores químicos, ao fator de conversão e ao período de utilização, bem como à sua capacidade de ser reutilizada após regeneração.

## **2.5 – Quitina como suporte de imobilização de enzimas**

A quitina e seus derivados têm sido extensivamente utilizados como suporte de várias enzimas, por preencherem a maioria dos quesitos necessários para utilização como suporte de enzimas. É um polissacarídeo inerte, hidrofílico, resistente, insolúvel em água e em praticamente todos os solventes. Sua estrutura apresenta grupos hidroxila e amina livre, que podem ser utilizados para a adsorção física de proteínas. Associada a um agente promotor de ligações cruzadas, como glutaraldeído em doses que variam de 0,1 a 2%, a quitina se torna um suporte para ligação covalente de proteínas com alta capacidade, e baixa taxa de dessorção. Exemplos de aplicação são descritos na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3** – Imobilização de enzimas em quitina, técnicas de imobilização utilizadas e retenção da atividade pós imobilização.

<b>Enzima*</b>	<b>Suporte</b>	<b>Técnica Utilizada</b>	<b>Retenção da Atividade [%]</b>
Fosfatase Ácida [3.1.3.2]	Quitina em pó	Ligação covalente com pré tratamento com glutaraldeído	20%
Pepsina [3.2.1.1]	Quitosana em gel	Ligação cruzada da solução enzima suporte com glutaraldeído	3%
Glucoamilase [3.2.1.3]	Quitina em pó	Ligação covalente e tratamento com glutaraldeído	90%
	Pérolas de quitosana com ligação cruzada	Ligação covalente com pré tratamento com glutaraldeído	53%
Lactase	Quitina em pó	Ligação covalente e tratamento com glutaraldeído	60%**

\* KRAJEWSKA, 1991;\*\* STANLEY *et al*, 1977.



ILYINA *et al.* [1999] imobilizaram o complexo de enzimas quitinolíticas de *Streptomyces kurssanovii* em quitina macroporosa por adsorção física. As quitinases deste complexo apresentaram alta afinidade ao suporte e apresentaram atividade específica de 25U/g suporte, retraindo totalmente a atividade da enzima livre.

Papaína foi inicialmente imobilizada em quitina para a utilização na indústria cervejeira, com o objetivo de clarificar a cerveja pós-fermentação [FINLEY *et al.*, 1977]. A turbidez da cerveja foi reduzida em 70% em relação à inicial para o tratamento com papaína livre e com complexo quitina:papaína em batelada. Para tratamentos contínuos em coluna de leito fixo, a turbidez da cerveja foi reduzida em até 75%. Estes dados indicam que a enzima imobilizada em quitina retém praticamente 100% da atividade da enzima livre, e se mostrou efetiva no tratamento de 5 litros de cerveja diluída, à vazão de 2 ml/min.

A ação da papaína imobilizada em quitina sobre a quitosana foi descrita por MUZZARELLI *et al.* [1994]. Em estudos de hidrólise de quitosana a 50°C, a solução reacional apresentou uma redução de 66% na viscosidade após 90 minutos de reação com relação ao controle. A enzima se manteve ativa por 168 horas sem perda de atividade, o que possibilita a utilização deste sistema em contínuo.

## 2.6 – Relações de Transporte de Massa – aproximação de Maxwell–Stefan [WESSELINGH & KRISHNA, 2000]

A primeira lei de Fick define que as espécies em uma mistura é proporcional ao gradiente de concentração e ao coeficiente de difusão. O fluxo é definido relativamente a uma referência, como a velocidade média molar da mistura.

$$J_i = -D_i \frac{dc_i}{dz} \quad \text{Lei de Fick}$$

$$\approx J_i = -D_i \frac{\Delta c_i}{\Delta z} = -k_i \Delta c_i$$

Usualmente, problemas de transferência de massa estão vinculados em definir os fluxos em referência a alguma interface ou fronteira. Neste caso, o fluxo  $N$  está definido como:

$$N_i = -D_i \frac{dc_i}{dz} + N \cdot x_i, \text{ onde } N = \sum_i N_i \text{ é o fluxo da mistura como um todo.}$$

O movimento em uma mistura é governada por forças inerentes às espécies individuais na mistura. Existem, nesse caso, dois tipos de forças:

1. **Forças motrizes**, que derivam de gradientes potenciais das espécies, e
2. **Forças de arraste** entre as espécies, que são consequência das diferenças de velocidade entre elas.

O primeiro conceito é o do potencial químico. O potencial químico é relacionado com a composição da mistura, e usualmente aumenta com a concentração das espécies. É dado por:

$$\mu_i = \text{const}(p, T) + RT \cdot \ln a_i$$

onde  $a_i = \gamma_i x_i$ .

Como se pode observar, o potencial químico é uma função logarítmica da atividade das espécies em solução, e esta atividade é o produto do coeficiente de atividade e a fração molar da espécie.

O uso de gradientes potenciais permitem a incorporação de forças motrizes diferentes, como gradientes de potencial químico e elétrico, gradientes de pressão e campos centrífugos.

O segundo conceito é o da fricção entre as espécies de uma mistura.

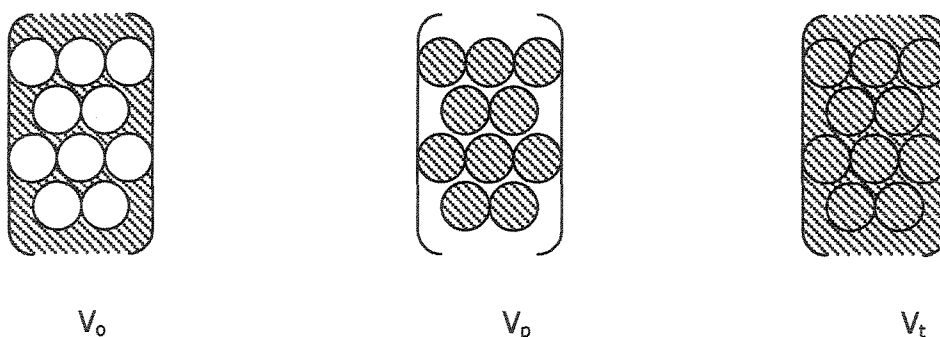
A aproximação da fricção para a interação entre espécies de uma mistura permite o manuseio consistente de qualquer número de componentes

## 2.7 – Cromatografia de permeação em gel de alta eficiência [CPGAE]

A CPGAE tem como princípio separação de moléculas de acordo com seu tamanho em solução. A solução de amostra é inserida na coluna, que é preenchida por um gel poroso não carregado, e a amostra é carregada pelo solvente (fase móvel) através da coluna. Devido à dificuldade de transporte dentro dos poros do recheio, moléculas maiores emergem primeiramente, enquanto que moléculas pequenas são retardadas pela difusão destas através dos poros.

A separação por tamanho acontece pela troca repetida das moléculas do soluto entre o seio do fluido e o líquido estagnado dentro dos poros do recheio. O tamanho do poro das partículas do recheio determina a faixa de massas molares através da qual a separação ocorre. Tipicamente, os géis são constituídos de macromoléculas com grande afinidade com o solvente utilizado. Estes foram polimerizados, ou ligados em ligações cruzadas, de forma a torná-lo insolúvel e, ao invés de solubilizarem em solução, estes incham, tomando para si grandes quantidades de líquido.

O princípio do método de CPGAE baseia-se somente nas diferenças de tamanho das moléculas de uma solução complexa; por esta razão, todas as substâncias constituintes de uma amostra devem ser eluídas da coluna cromatográfica entre dois pontos bem estabelecidos:  $V_o$ , ou volume de exclusão total (correspondente ao espaço intersticial entre as partículas do recheio) e  $V_t$ , volume de permeação total (correspondente ao volume total de líquido presente na coluna). Entre  $V_o$  e  $V_t$  ocorre o processo de separação, dependente do tamanho das moléculas presentes na solução em relação ao tamanho do poro.



**Figura 2.4** – Variáveis usadas para caracterizar o recheio cromatográfico.

Uma das mais importantes aplicações da CPGAE é a determinação de massas molares, particularmente de proteínas e outros polímeros. Para muitos grupos de

substâncias a correlação entre as massas molares e seu comportamento na eluição é muito próxima, e para propósitos práticos o volume de eluição é determinado inteiramente pela massa molar.

### 2.7.1 – Relação entre massa molar e volume de eluição – curva de calibração

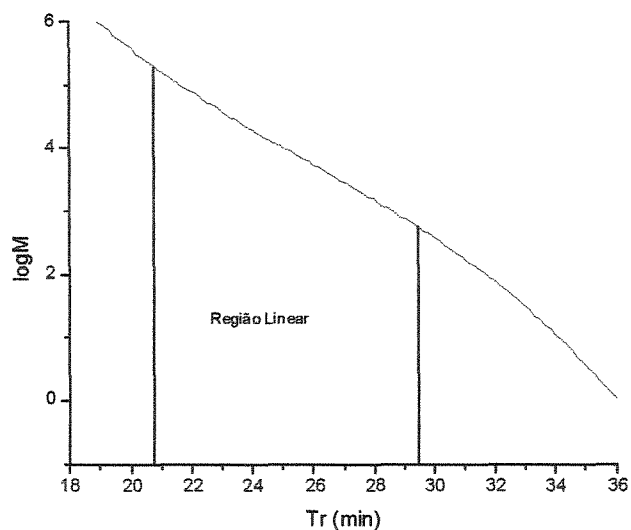
Na ausência de frações padrão de polissacarídeos a serem analisadas por CPGAE, padrões secundários, constituídos de frações caracterizadas de outro polissacarídeo podem ser utilizados na calibração. É importante ressaltar que valores de massas molares obtidos desta maneira não têm nenhum significado em termos absolutos, a menos que a conformação molecular dos padrões secundários em solução seja similar à dos analitos [CHURMS, 1995]. O grande valor de determinações de massa molar por CPGAE utilizando padrões secundários de calibração reside na facilidade em se analisar mudanças progressivas na massa molar do analito em experimentos de degradação ou agregação.

Uma vez obtidos os padrões, a função de calibração pode ser escrita como uma função polinomial [SCHRÖDER et al,1989]:

$$\log M = a_0 + a_1 V_e + a_2 V_e^2 + \dots + a^n V_e^n , \quad [2.1]$$

onde  $a_0, a_1, a_2, \dots, a_n$  são constantes específicas do sistema cromatográfico utilizado, e  $V_e$  é o volume de eluição [em ml]. A curva  $\log M$  *versus* volume de retenção fornece a curva de calibração do sistema. É desejável que o ajuste da curva seja determinado pela regressão linear, uma vez que é na faixa linear onde ocorrerá a separação. O volume de retenção pode ser substituído pelo tempo de retenção na coluna se o fluxo é constante durante a aquisição dos cromatogramas.

Uma vez que muitas propriedades físicas e químicas dos polímeros podem variar com o tamanho da molécula, as curvas de calibração são válidas apenas para uma condição de operação bem estabelecida. Uma vez alterada esta condição, a curva se torna inválida.



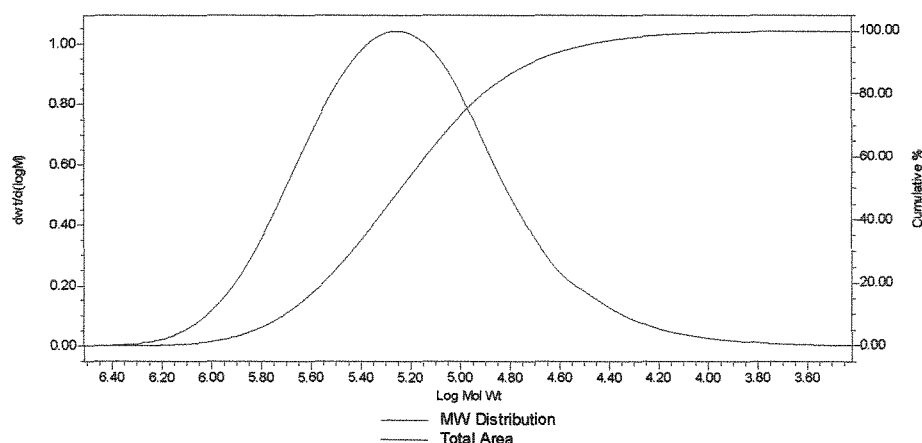
**Figura 2.5** – Curva de calibração típica em CPGAE.

### **2.7.2 – Determinação da distribuição de massas molares – Curva cumulativa**

A massa molar de uma molécula é caracterizada pelo seu diâmetro em solução. Enquanto uma substância de baixa massa molar apresenta uma massa molar uniforme, todas as substâncias sintéticas e muitas substâncias macromoleculares naturais são polidispersas em sua massa molar, apresentando uma distribuição de massas molares.

A relação entre a massa molar de compostos polidispersos e o comportamento de eluição em colunas de CPGAE torna possível determinar as massas médias molares, bem como sua curva cumulativa, de maneira rápida.

A curva cumulativa informa quantitativamente o teor de material presente no analito. A área sob a curva gerada pelo cromatograma é correspondente à massa total do analito aplicado, portanto, é possível determinar a fração mássica do polímero correspondente a uma certa massa molar.



**Figura 2.5** – Curva de distribuição cumulativa.

Uma vez determinada a curva de distribuição é possível calcular as relações de pesos médios moleculares característicos do polímero, que tem como fórmula geral:

$$M^* = \frac{\sum n_i M_i^c}{\sum n_i M_i^{c-1}} \quad [2.2]$$

onde:

C	M*
1	Massa molar média numérica [Mn]
2	Massa molar média ponderal [Mw]
3	Massa molar média z
4	Massa molar média z+1

É importante ressaltar aqui que as massas médias molares obtidas por CPGAE são de natureza relativa, ou seja, são calculadas por uma relação indireta entre o tamanho das moléculas dos padrões utilizados na calibração e o analito. Individualmente estas médias podem ser determinadas por métodos absolutos, tais como os descritos na Tabela 2.4.

**Tabela 2.4** – Métodos absolutos utilizados na determinação de pesos médios moleculares.

<b>Método</b>	<b>Faixa de massa molar [g/mol]</b>	<b>Massa média determinada</b>
Osmometria de membrana	$10^4 - 10^6$	Mn
Ebulioscopia, Crioscopia	$<10^4$	Mn
Espalhamento de luz	$10^2-10^8$	Mw
Equilíbrio de sedimentação	$<10^6$	Mw, Mz, Mz+1

### **2.7.3 – Aplicação da CPGAE em determinação de massas molares de soluções de quitosana**

Quitosanas (G.A.20%) são solúveis em ácido acético diluído, no qual o polímero se comporta como um polieletrólito catiônico [TERBOJEVICH *et al.*, 1993]. Para polissacarídeos neutros, como a dextrana, a caracterização de polieletrólitos em CPGAE aquoso é muito complexa, devido à possibilidade de interação com a resina se a fase móvel não for cuidadosamente selecionada.

BERI *et al.* (1993) descreveram a caracterização de quitosanas por CPGAE – fotômetro de espalhamento de luz de ângulo múltiplo (ELAM), que permite a obtenção das massas molares absolutas das amostras de quitosana. Foram utilizadas as colunas BioGel TSK60 (7,5x300mm, matriz poliéter hidroxilado) e duas colunas BioGel TSK50 (7,5x300mm, matriz poliéter hidroxilado) e fase móvel ácido acético (AcOH) 0,33M/acetato de sódio (NaOAc) 0,1M pH 4,2 e fluxo 0,6 ml/min. Verificou-se que esta técnica proporcionou dados confiáveis em termos das distribuições das massas molares absolutas na faixa estudada. A determinação das massas molares pela calibração secundária (utilizando dextranas como padrões) superestimou o valor das massas molares das amostras, devido à dissimilaridade entre as amostras e os padrões em solução.

TERBOJEVICH *et al.* (1993) descreveram a curva de calibração utilizando amostras polidispersas de quitosana (GA 15%) obtidas por hidrólise química com HCl 0,6M, temperatura de 50°C e tempo de reação 30 minutos, 12 h e 33 h. Foram utilizadas

A quitina em pó (5 g, Sigma), de granulometria controlada (peneiradas entre 0,35-0,50 mm de diâmetro) foi suspensa em tampão fosfato (30 ml, 0,1 M, pH 7,6) e incubada a 4°C até a hidratação da fibra. Separadamente, a enzima (220 mg) foi dissolvida na seguinte solução (10 ml): cisteína 5mM, EDTA 5mM; mercaptoetanol 1μM. A solução enzimática foi adicionada à quitina e mantida sob refrigeração a 4°C por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 500 μl de solução de glutaraldeído a 10% (concentração final 0,1%) e a mistura foi mantida sob baixa agitação por 12 horas a 4°C. O complexo quitina-papaína foi filtrado, misturado a uma solução de NaCl 3M com agitação por 3 horas e a seguir lavado com água destilada para a retirada da solução salina.

### **3.3 – Caracterização do suporte para imobilização**

#### **3.3.1 – Classificação granulométrica**

Quitina (Sigma, lote 68H7014) foi classificada de acordo com sua granulometria com o auxílio de peneiras do tipo Tyler. A partir da classificação granulométrica o material com faixa entre 0,35 e 0,50 mm foi escolhido.

#### **3.3.2 – Análise da área superficial da quitina**

As amostras foram previamente desumidificadas em estufa a vácuo (FANEM) a 60°C por quatro horas. Aproximadamente 250 mg das amostras foram submetidas a um tratamento de 140°C por duas horas até que toda a umidade fosse retirada. A caracterização da área superficial do adsorvente e do complexo quitina: papaína foi conduzida em um equipamento de fisissorção de N<sub>2</sub> – Micromeritics ASAP 2000, a 77K, do Laboratório de Uso Comum da FEQ. A partir das isotermas obtidas, o volume de micro, meso e macroporos foi calculado.

#### **3.3.3 – Microscopia eletrônica de varredura da superfície**

Quitina (natural e submetida à imobilização de papaína) foram submetidas à análise de superfície por microscopia eletrônica de varredura. Os materiais foram



**CAPÍTULO 3****MATERIAIS E MÉTODOS****3.1. Grau de Acetilação da Quitosana [Roberts, 1997]**

Alíquotas de 1 ml de solução de corante (0,5 µM de corante Orange II em ácido acético 0,1M) foram adicionadas a 10 frascos volumétricos de 10 ml e 4 ml de ácido acético 0,1M foram a seguir acrescentados. Volumes entre 0 e 2,5 ml de solução de quitosana (0,1 g/l em ácido acético 0,1M) foram adicionados aos tubos e completados para 10 ml com a solução de ácido acético. Após agitação, os valores de absorbância a 484 nm, foram determinados usando o ácido acético como referência.

A interseção entre as curvas de tendência fornece a concentração equivalente de grupos acetila da molécula, calculada por:

$$EW = \frac{V_i Ms}{C_c}; \text{ onde:}$$

EW= peso equivalente de grupos acetilados;

Ms= massa seca de amostra;

Cc= concentração de corante ( padronizada em  $4,5 \times 10^{-4}$  M).

$$^{\circ} \text{Acetilação} = \frac{(EW - 161) * 100}{EW + 42};$$

onde 161 e 42 são as massas molares da glucosamina e do grupo acetila, respectivamente.

**3.2 – Imobilização de papaína em quitina**

Papaína comercial foi gentilmente cedida pela Prozyn, com atividade de 45.900 USP/mg e dosagem de proteínas 0,35 g proteínas/g [SEDMAN & GROSSBERG, 1977]. A imobilização foi realizada de acordo com FINLEY *et al.* [1977], com algumas modificações.

submetidos à metalização por liga Au-Pd a frio e alto vácuo por 180 segundos. Posteriormente as amostras foram submetidas à análise em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol, da Faculdade de Engenharia Mecânica da Unicamp.

### **3.4 – Hidrólise da quitosana por papaína livre e imobilizada**

A quitosana GD 80% utilizada foi gentilmente fornecida pelo Parque de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal do Ceará (Ceará), proveniente de cascas de caranguejo.

Papaína livre e imobilizada (em concentração final 0,45 g<sub>proteínas</sub>/l) foram adicionadas à solução de quitosana (10 g/l em ácido láctico 0,15 M) em reatores batelada (com volume de 40 ml) encamisados a 50°C. O pH resultante da mistura reacional foi de 3,2. O acompanhamento da viscosidade foi feito a 25°C simultaneamente ao experimento. Amostras foram retiradas periodicamente, centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos e separadas do material sólido. Uma solução controle foi conduzida paralelamente a todos os ensaios, nas mesmas condições do experimento, diferindo das anteriores pela ausência de enzimas na mistura reacional.

A atividade da papaína frente a quitosana foi avaliada pela modificação da solução polimérica utilizando técnicas de viscosimetria e análise por CPGAE

Para a avaliação da produção de oligômeros de quitosana, amostras do hidrolisado de quitosana (3 ml) foram neutralizadas pela adição gradativa de NaOH 5M (30 µl), resfriadas por 10 minutos em banho de gelo e centrifugadas por 15 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante (1 ml) foi separado e submetido à liofilização. O produto resultante foi solubilizado em 1 ml de acetonitrila: água 50:50 (v/v), filtrado por membranas Millipore de 0,45 µm, e submetidos à análise por CLAE.

### **3.5 – Hidrólise de quitina coloidal pela enzima quitinase fúngica**

Vinte mililitros de quitina coloidal 1% em tampão acetato de sódio 100mM, pH 5,2) e 19,6 ml de tampão acetato 100mM foram adicionados a um reator encamisado de

40 ml à temperatura de 37°C. Adicionou-se 400µl de caldo de fermentação de *Trichoderma* sp com tempo de fermentação de 24 horas e atividade de 1,08 U/ml [RIBEIRO, 2000].

Imediatamente após a adição do caldo a reação foi incubada e as amostras foram retiradas periodicamente e centrifugadas para a retirada do material sólido.

Para a avaliação da produção de oligômeros, amostras do hidrolisado (5 ml) centrifugadas por 15 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante (5 ml) foi separado por filtração e submetido à liofilização. O produto resultante foi solubilizado em 1 ml de acetonitrila: água 70:30 (v/v), filtrado por membranas Millipore de 0,45 µm, e submetidos à análise por CLAE.

### 3.6 – Análise viscosimétrica da mistura reacional

A viscosidade da solução reacional foi determinada à temperatura ambiente pela medida do tempo de escoamento livre de um volume de 0,5 ml em pipetas de 1,0 ml consideradas idênticas. As medições foram repetidas 10 vezes para a obtenção do desvio experimental. A alteração da viscosidade foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ Redução} = \frac{T_C - T_E}{T_C} \times 100 \quad (3.6)$$

onde  $T_E$  é o tempo de escoamento (em segundos) referente à mistura reacional de hidrólise e  $T_C$  corresponde ao tempo de escoamento (em segundos) do controle, conduzido às mesmas condições do experimento.

### 3.7 – Análise das amostras por CPGAE

#### 3.7.1 – Preparo das amostras

Amostras de quitosana foram preparadas na concentração de 1,0 mg/ml em fase móvel AcOH 0,33 M/ NaOH 0,1 M, pH 3,9 ± 0,2. Após a solubilização, as amostras foram filtradas para vials de 1,0 ml por membranas Millipore de 0,45 µm.

As amostras de quitosana hidrolisada, com concentração inicial de 10 mg/ml, foram diluídas para 1,0 mg/ml com a fase móvel e filtradas para frascos especiais por membranas 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore). Todas as amostras foram mantidas em freezer a análise para prevenir a hidrólise ácida.

### 3.7.2 – Preparo dos padrões

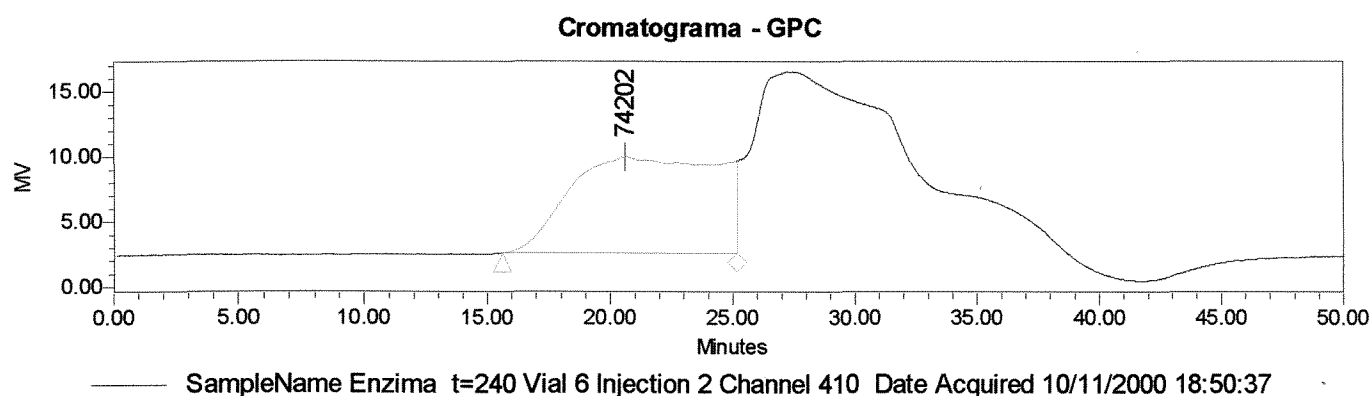
Foram utilizados padrões de dextrana (Sigma) em concentração de 2,5 mg/ml, com massa molar  $2 \times 10^6$ , 473.000, 65.282, 38.800 e 9.400  $\text{g.mol}^{-1}$ . Um padrão de D-glucosamina HCl (Seikagaku, peso molar 212  $\text{g.mol}^{-1}$ ) foi utilizado. Os padrões foram preparados em fase móvel AcOH 0,33 M/ NaOH 0,1 M, filtrados para frascos especiais por membranas (0,45  $\mu\text{m}$ ) Millipore e mantidos em geladeira até a injeção.

### 3.7.3 – Condições analíticas

O equipamento utilizado era formado por duas bombas modelo 515, injetor automático de amostras modelo 717 plus e detetor Índice de refração modelo 410, todos da marca Waters e software Millenium32<sup>®</sup> GPC utilizado como controlador do sistema cromatográfico. O estojo de colunas utilizado foi constituído das colunas Ultrahydrogel 1000 e Ultrahydrogel 500 (Waters), de poli-metilmacrilato hidroxilado, com volumes de exclusão de  $5 \times 10^6$  e  $8 \times 10^4$ , respectivamente, conectadas em série. O volume de amostra injetado foi de 200  $\mu\text{l}$ . A fase móvel utilizada foi AcOH 0,33M/ NaOH 0,1M pH  $3,9 \pm 0,2$ , fluxo de 0,8 ml/min e temperatura 40°C, com detetor índice de refração.

### 3.7.4 – Análise dos resultados

As massas molares médias foram calculadas empregando o software Millenium<sup>®</sup> 32, pela integração dos perfis cromatográficos obtidos na região de massas molares maiores (correspondentes à região entre  $2 \times 10^6$  e 2500). Para realizar estes cálculos, o software emprega a curva cumulativa (gráfico percentual que representa a relação entre as massas molares e a sua fração mássica). Uma vez construída a curva cumulativa, é possível calcular relativamente às massas molares características utilizando as equações previstas na seção 2.6.

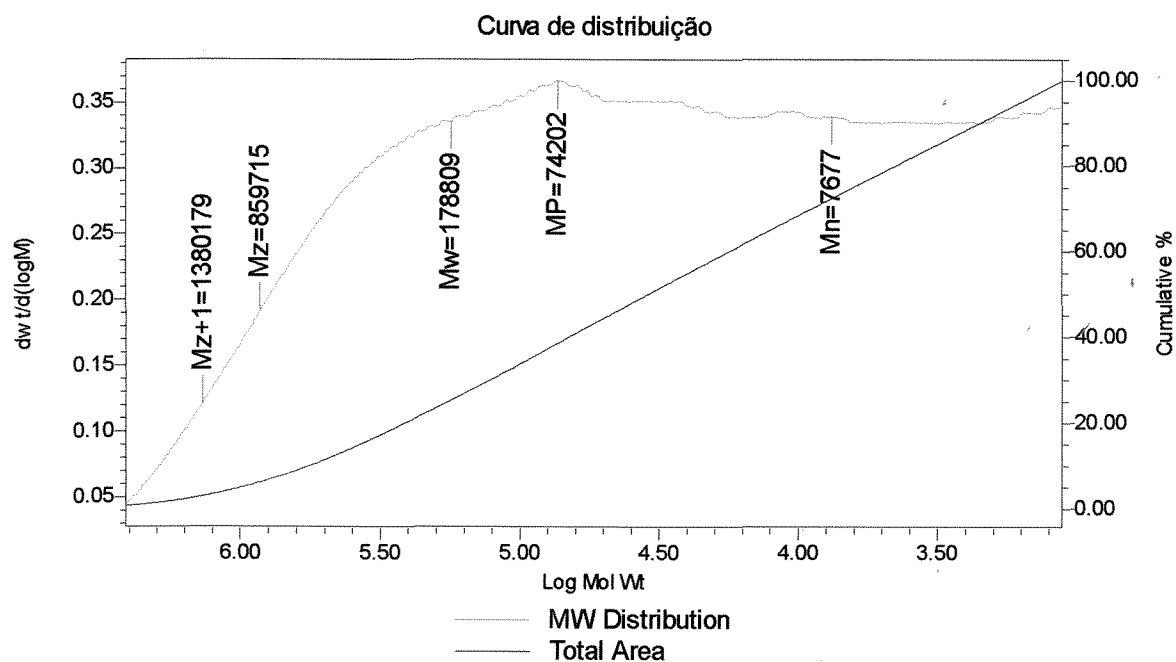


(a)

**GPC Results**

Dist Name	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	Mv	Polydispersity	MW Marker 1	MW Marker 2
1	7677	178809	74202	859715	1380179		23.291978		

(b)



(c)

**Figura 3.1.** Modelo de documento gerado pelo programa. (a) Área integrada, (b) tabela de massas molares calculadas, e (c) curva de distribuição cumulativa.

### **3.8 – Análise das amostras por CLAE**

#### **3.8.1 – Preparo dos padrões de oligômeros de quitosana**

Foram utilizados padrões de oligômeros de GlcN (Seikagaku), monômero a hexâmero, em concentração de 1 mg/ml. Os padrões foram preparados em fase móvel (acetonitrila : água 50:50 v/v), filtrados para frascos especiais por membranas (0,45 µm) Millipore e mantidos em freezer a até a injeção.

#### **3.8.2 – Preparo dos padrões acetilados**

Foram utilizados padrões de oligômeros acetilados (Seikagaku), monômero a heptâmero, em concentração de 1 mg/ml. Os padrões foram preparados em fase móvel (acetonitrila : água 70:30 v/v), filtrados para frascos especiais por membranas (0,45 µm) Millipore e mantidos em geladeira até a injeção.

#### **3.8.3 – Condições analíticas**

As amostras acetiladas foram analisadas por CLAE de acordo com o método. A coluna utilizada foi a µBondapak NH<sub>2</sub> (3,9 mm x 30 cm) Waters, de sílica aminada. Foi utilizado gradiente linear com fluxo de 0,8 ml/min de soluções A e B. Solução A: acetonitrila : água, em proporção 70:30 (v/v) e Solução B: acetonitrila:água 50:50 (v/v). A absorbância a 210 nm foi monitorada por detector UV486 (Waters).

Para as amostras desacetiladas, o procedimento foi conduzido de acordo com IZUME & OTHAKARA (1987) com modificações. A coluna utilizada foi a µBondapak NH<sub>2</sub> (3,9 mm x 30 cm) Waters, de sílica aminada, em sistema isocrático de fase móvel acetonitrila : água, em proporção 55:45 (v/v), em fluxo de 0,8 ml/min e detector de índice de refração modelo RI 410 (Waters), com 8x atenuação.

### **3.9 – Determinação de Proteínas [SEDMAN & GROSSBERG, 1977]**

A determinação de proteínas usando o corante Coomassie Blue G250 depende da conversão entre a forma livre (que tem cor marrom-avermelhada) à sua forma ligada (que apresenta cor azul intenso) devido à interação do corante com os grupos NH<sub>3</sub><sup>+</sup> das

proteínas em meio ácido. As vantagens do uso deste método estão na simplicidade e rapidez do ensaio, sua alta reprodutibilidade e sensibilidade, detectando menos de 1 µg de proteína em amostras e na ausência de interferência dos aminoácidos livres. Entretanto, a intensidade da leitura depende da composição da proteína, e a precisão dependerá da proteína padrão escolhida.

### **3.9.1 – Preparação do Corante**

O corante Coomassie Blue G250 (Sigma) foi preparado como solução a 0,06 % em HCl 1,5 % (m/v), mantido sob agitação por 12 horas e filtrado em papel Whatman nº1. As soluções tem validade longa a temperatura ambiente se estocada em frascos escuros.

### **3.9.2 – Construção da Curva Padrão de Albumina de soro bovino (BSA)**

Foi preparada uma solução estoque de BSA (0,2 mg/ml) em água destilada, e desta foram preparadas soluções em triplicata contendo de 1,0 a 100,0 µg , e completadas com água destilada até volume de análise de 1,5 ml. Posteriormente foi adicionado aos tubos 1,5 ml do corante Coomassie-Blue. A absorbância das amostras foi medida em dois comprimentos de onda, a 465 nm (espectro vermelho – forma livre) e 595 nm (espectro azul – forma ligada) em espectrofotômetro, com água destilada como referência. A curva foi construída levando em consideração a relação entre a média das absorbâncias a 595 nm e 465 nm ( $ABS_{595}/ABS_{465}$ ) e a massa de proteínas adicionada (em µg de proteína).

### **3.9.3 – Dosagem de proteínas em amostras**

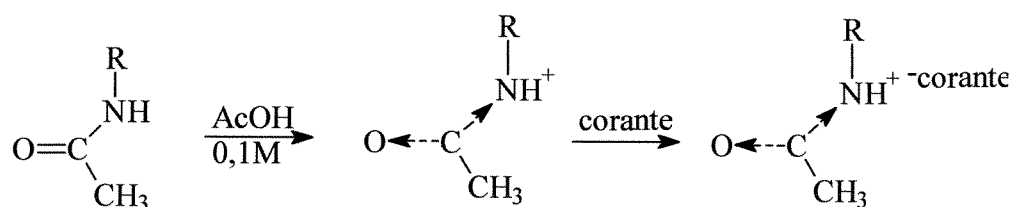
As soluções foram convenientemente diluídas a volume final de amostra 1,5 ml, em triplicata. Adicionou-se 1,5 ml do corante às amostras de proteína, agitou-se por inversão e a absorbância foi lida em espectrofotômetro para dois comprimentos de onda, a 465 nm (espectro vermelho – forma livre) e 595 nm (espectro azul – forma ligada), com água destilada como referência. A massa de proteínas foi calculada pela relação entre os comprimentos de onda ( $ABS_{465}/ABS_{595}$ ) interpolado na curva de calibração de BSA.

## CAPÍTULO 4

## MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO POLÍMERO QUITOSANA

## 4.1 – Grau de Acetilação de Quitosana

A determinação do grau de acetilação é baseada na protonação do grupo acetila das moléculas dos polímeros quando este se encontra em solução ácida. O corante usado foi o Orange II, aniônico, cuja absorbância é máxima a 484nm.

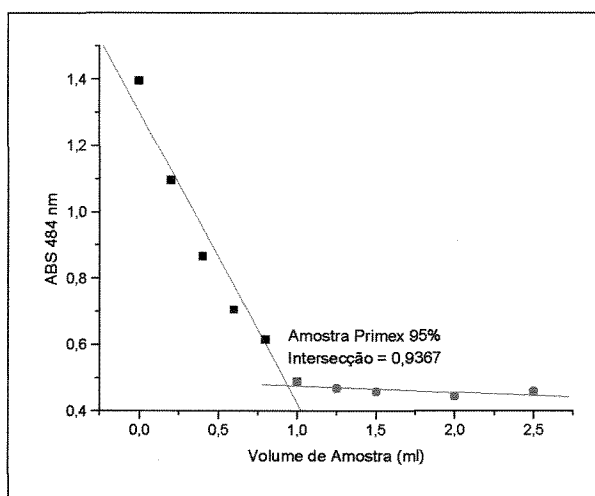


R= grupo piranosídico.

A titulação metacromática é um método rápido, consistindo na mistura entre as soluções de quitosana e a solução de corante, com posterior leitura da absorbância a 484nm em espectrofotômetro.

À medida que a concentração de grupos acetila aumenta, a absorbância da solução decresce até um valor de concentração crítica de quitosana em equilíbrio com corante. Volumes acima do volume crítico não alteram os valores de absorbância. Graficamente há uma mudança de tendência da curva de titulação, como apresentada na Figura 4.1.





**Figura 4.1** – Determinação do grau de acetilação para a Amostra Primex 90%.

Foram analisadas amostras de quitosana de várias procedências. A Tabela 4.1 resume os principais resultados obtidos por este método.

**Tabela 4.1** –Grau de desacetilação de quitosanas obtidos por titulação. \* - Grau de desacetilação especificado no rótulo, obtidos por Infravermelho [referência Primex]; \*\* - NI → não informado; \*\*\* - Informado pelo fabricante.

Amostra	Procedência	G.D.(%)*	GD análise (%)	Erro
Quitosana Grau Prático	Sigma	NI**	<b>86,9</b>	-
Quitosana "From Crab Shells"	Sigma	NI	<b>80,0</b>	-
Quitosana Grau Alimentício	Primex	80,0	<b>75,0</b>	<b>6,3</b>
Quitosana Grau Alimentício	Primex	85,0	<b>78,4</b>	<b>7,7</b>
Quitosana Grau Alimentício	Primex	90,0	<b>80,7</b>	<b>10,4</b>
Quitosana Grau Alimentício	Primex	95,0	<b>95,05</b>	<b>~0,0</b>
Quitosana	Polymar – Ceará	~80***	<b>80,03</b>	-

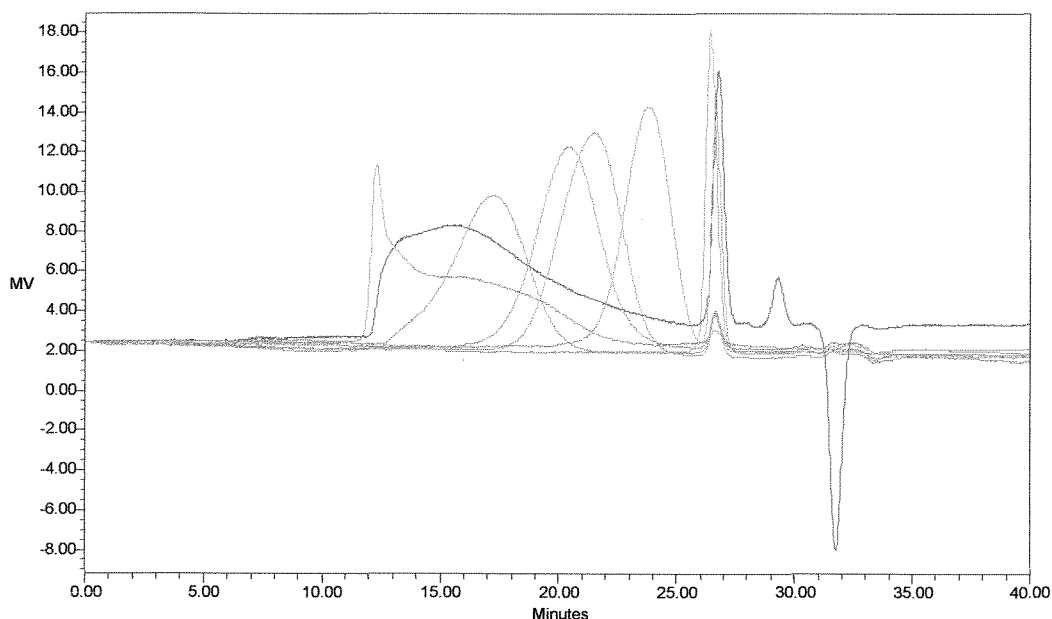
Obteve-se um desvio relativamente grande (10%) para a amostra de quitosana da Primex, com grau de desacetilação de rótulo 90%. No entanto, praticamente não há erro para a amostra de 95% do mesmo fabricante. Os valores de erro podem ser

explicados devido ao fato de o método determinar indiretamente a concentração dos grupos acetila da molécula.

O método é de rápida execução, apresenta resultados apenas comparáveis aos obtidos por espectroscopia de infravermelho, mais precisos do que este método por determinar diretamente a concentração dos grupos acetilados da molécula.

#### 4.2 – Distribuição de massas molares - Quitosana

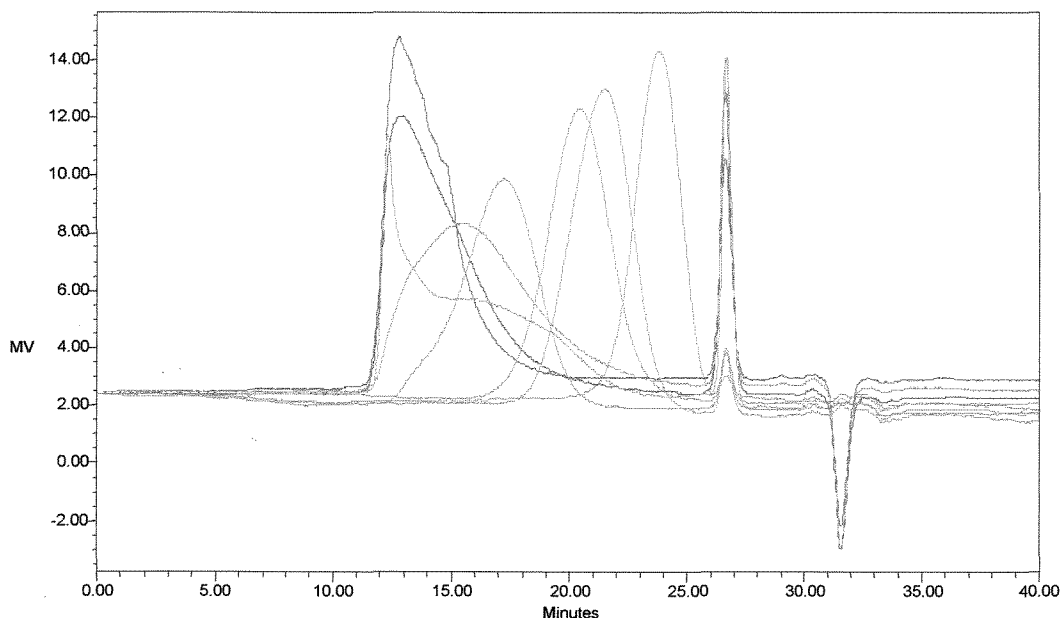
As quitosanas de procedências diferentes foram analisadas pela técnica de CPGAE e foram representadas nas Figuras 4.2 e 4.3.



**Figura 4.2** – Perfil dos padrões (---) ( $2 \times 10^6$ , 473000, 65282, 38800, 9400 e D-glucosamina, respectivamente), e quitosana Padetec [GD 0,80] (—), 1 mg/ml, volume de injeção  $200 \mu\text{l}$ . Colunas Ultrahydrogel 1000 e 500 (Waters), fase móvel AcOH 0,33M/NaOH 0,1M, fluxo 0,8 ml/min. Temperatura das colunas:  $40^\circ\text{C}$ . Detetor índice de refração.

De acordo com a análise do cromatograma, observa-se que a quitosana Padetec apresenta uma distribuição de massa molar larga, apresentando um perfil mais distribuído na região de massas molares e indicando elevado grau de polidispersão.

A Figura 4.3 apresenta os resultados para as análises de amostras diferentes de quitosanas, fornecidas pela Sigma. Estas são denominadas AV (alta viscosidade), MV (média viscosidade) e BV (baixa viscosidade).



**Figura 4.3** – Perfil dos padrões (---) e amostras de quitosanas Sigma AV(—), MV(—), BV (—), 1 mg/ml, volume de injeção 200 $\mu$ l. Colunas Ultrahydrogel 1000 e 500 (Waters), fase móvel AcOH 0,33M/NaOH 0,1M, fluxo 0,8 ml/min. Temperatura: 40°C. Detetor índice de refração.

As quitosanas Sigma apresentam menor valor de polidispersão, como pode ser observado nos cromatogramas. A redução da polidispersão torna os polímeros mais homogêneos com respeito aos tamanhos de cadeia.

**Tabela 4.2** – Massas médias molares obtidas por CPGAE.

Amostra	$M_n$	$M_w$	$M_z$	$M_{z+1}$	PD
Quitosana Padetec	79.757	627.746	1.031.490	1.283.705	7,87
Quitosana Sigma AV	1.079.582	1.243.371	1.389.014	1.507.981	1,15
Quitosana Sigma MV	783.027	1.074.351	1.301.376	1.462.988	1,38
Quitosana Sigma BV	173.750	670.755	998.423	1.234.584	3,88

É importante notar, pela Tabela 4.2, que a classificação como alta, média e baixa viscosidade para os polímeros da Sigma pode ser consequência da variação de  $M_n$  na amostras, sendo este o parâmetro que mais apresentou variação entre as amostras. Observou-se também que a distribuição de massas molares obtidas para quitosana Padetec se assemelha à quitosana de baixa viscosidade.

A não disponibilidade de padrões tem ditado o uso de padrões indiretos na determinação de polímeros naturais, como dextranas. A análise das amostras da Sigma sugere que estas podem ter sido obtidas através de fracionamento preparativo. Uma vez caracterizadas por técnicas absolutas de determinação de massas moleculares, as amostras poderiam ser potencialmente empregadas como padrões de alta massa molar, minimizando o erro ocasionado por técnicas indiretas de calibração.

#### **4.3 – Efeito das condições de reação na atividade catalítica**

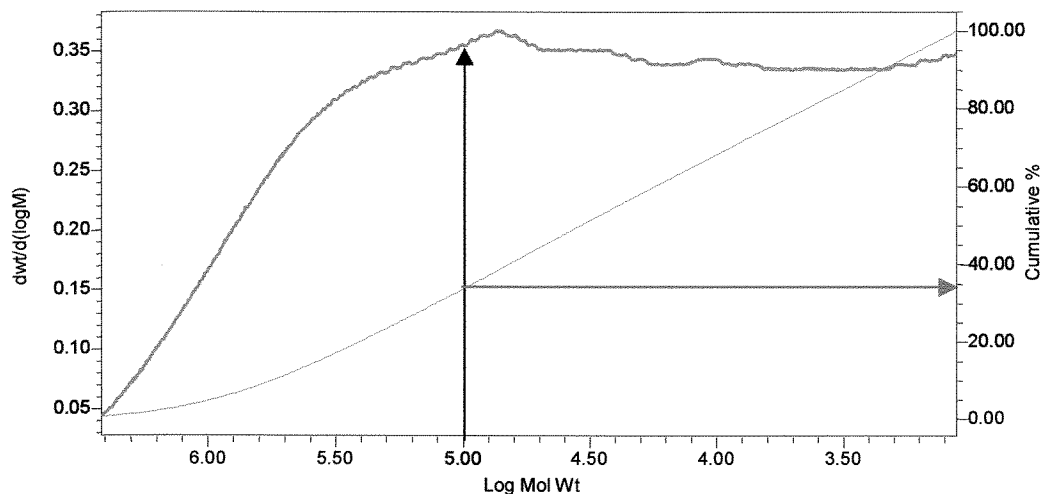
Para todos os estudos a concentração de enzima foi mantida a 0,45 g/l e a hidrólise foi acompanhada por 240 minutos. Viscosidade do meio reacional foi determinada a 25°C pelo tempo de escoamento de 0,5 ml de solução em pipetas idênticas de 1 ml. O tempo de homogenização da mistura reacional foi padronizado em 2 minutos para todos os experimentos.

Com o objetivo de se estudar a ação catalítica da papaína na estrutura polimérica da quitosana, amostras de hidrólise foram retiradas do meio reacional e analisadas por CPGAE. As massas molares médias foram calculadas empregando o software Millennium 32, pela integração dos perfis cromatográficos obtidos em quatro regiões diferentes compreendidas no intervalo entre  $2 \times 10^6$  e 2500.

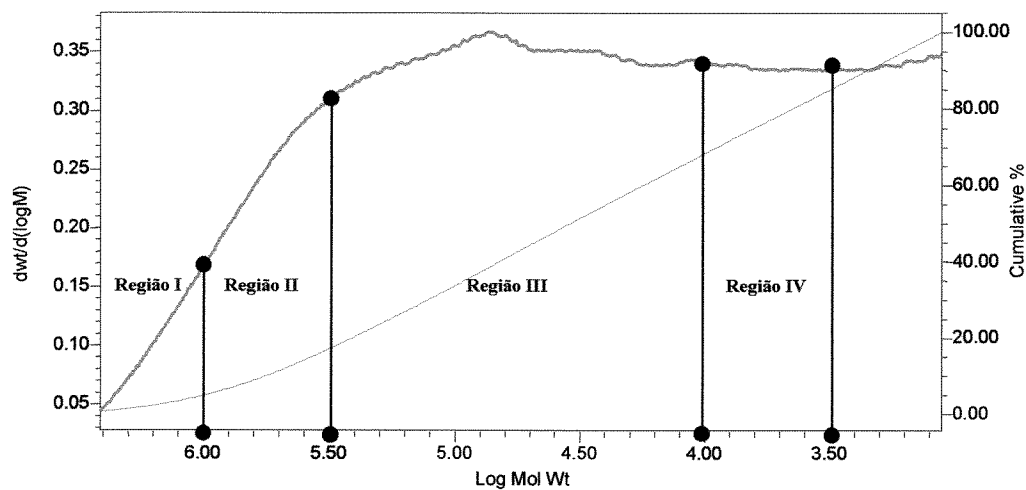
Os valores das massas molares ( $M_{z+1}$ ,  $M_z$ ,  $M_w$ ,  $M_p$  e  $M_n$ ) foram tomados como parâmetros na análise da alteração das massas molares, mas estes não devem ser considerados valores absolutos, uma vez que a técnica de GPC fornece estes dados relativos à curva de calibração utilizando dextranas como padrões estreitos.

A curva de distribuição cumulativa (baseada na área integrada da região abaixo da massa molar desejada) foi utilizada para determinar a fração mássica correspondente as massas molares características. A percentagem é determinada utilizando gráficos similares ao apresentado na Figura 4.4, pelo prolongamento do eixo da ordenada até a

curva cumulativa, em uma certa massa molar ( $\log M$ ). Foram analisadas quatro regiões do cromatograma com respeito a distribuição cumulativa, e estas são representadas na Figura 4.5.



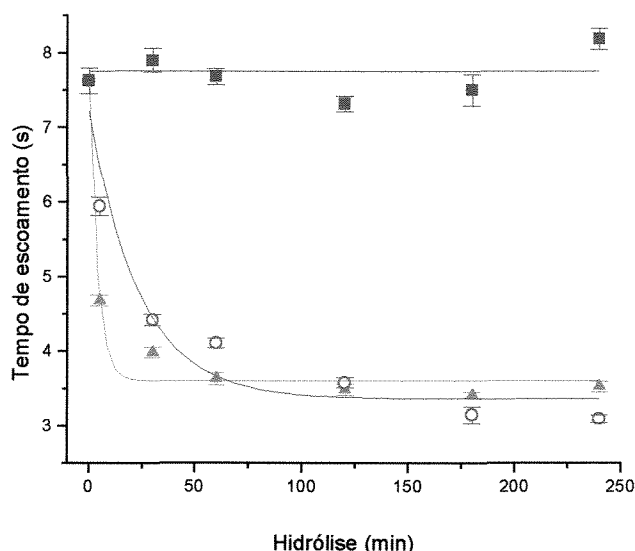
**Figura 4.4** – Exemplo de cálculo desenvolvido a partir da curva de distribuição cumulativa (—).



**Figura 4.5** – Exemplo de cálculo desenvolvido a partir da curva de distribuição cumulativa (—).

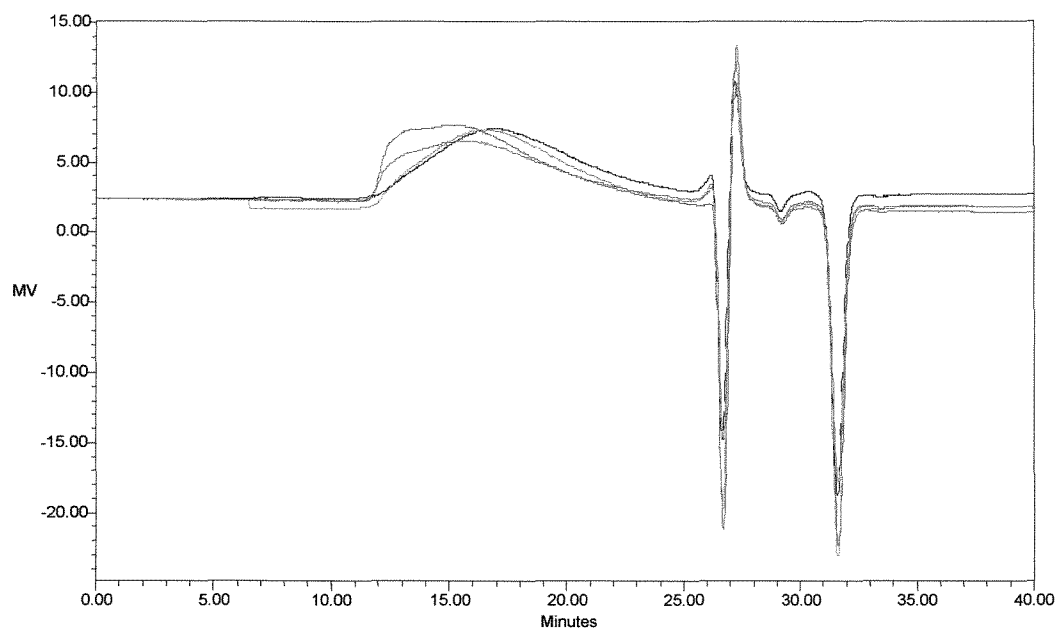
#### 4.3.1 – Condição 1: pH 3,2 T=50°C

Os resultados obtidos para a hidrólise de solução de quitosana (10 g/l) a pH 3,2 e 50°C com papaína livre e imobilizada (13 mg proteína/g quitina) estão apresentados na Figura 4.6.

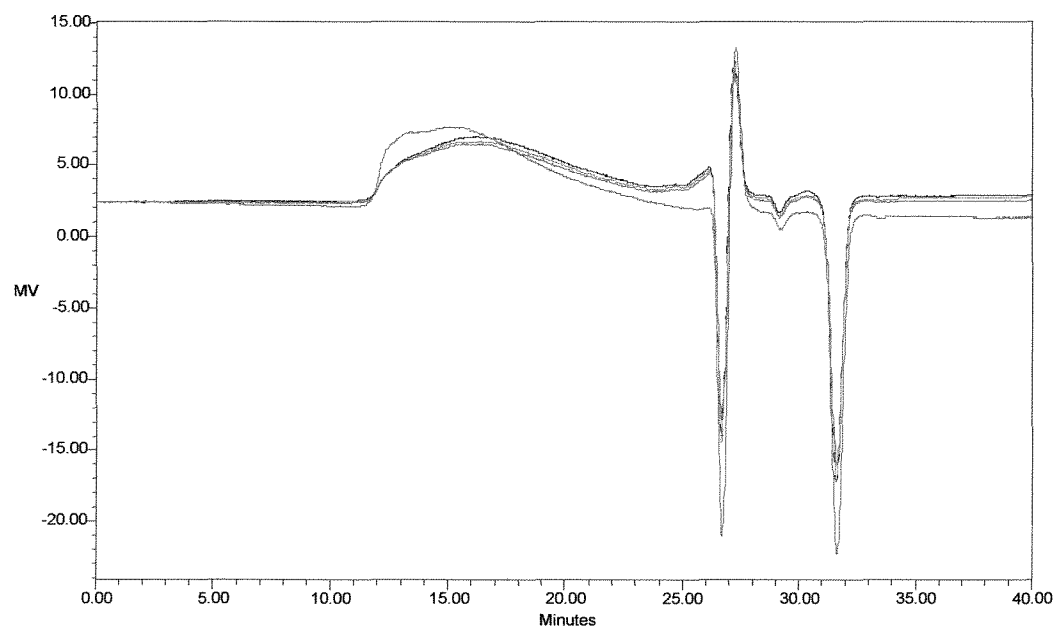


**Figura 4.6** – Tempo de escoamento da solução de hidrólise (10 g/l) pela papaína imobilizada em quitina (13 mg proteína/g quitina) (○) e pela papaína livre (▲), com concentração final de 0,45 g/l a 50°C e pH 3,2, com relação ao controle (■).

Pode-se observar para este experimento que a ação da enzima imobilizada frente ao substrato se torna gradativamente mais pronunciada que a enzima livre após 90 minutos, e após 240 minutos de reação a redução de tempo de escoamento atinge 70% para os ensaios com enzima imobilizada. Para o ensaio com enzima livre a redução de tempo de escoamento atinge 55%. As Figuras 4.7 e 4.8 apresentam a progressão cinética de hidrólise enzimática acompanhada por CPGAE.



**Figura 4.7** – Progressão temporal da hidrólise enzimática de quitosana com papaína imobilizada (0,45 g/l) a pH 3,2 e 50°C. (—) Quitosana; (---) t=0 min; (····) t=120 min; (- · - ·) t=240 min. Colunas Ultrahydrogel 1000 e 500 em série, fase móvel AcOH 0,33M/NaOH 0,1M, fluxo 0,8 ml/min, temperatura: 40°C. Detector índice de refração.



**Figura 4.8** – Progressão temporal da hidrólise enzimática de quitosana com papaína livre (0,45 g/l) a pH 3,2 e 50°C. (—) Quitosana; (---) t=0 min; (····) t=120 min; (- · - ·) t=240 min. Colunas Ultrahydrogel 1000 e 500 em série, fase móvel AcOH 0,33M/NaOH 0,1M, fluxo 0,8 ml/min, temperatura: 40°C. Detetor índice de refração.

Pela análise do perfil dos cromatogramas, observou-se para a ação da papaína imobilizada o deslocamento dos picos para a região de menor massa molar em comparação aos perfis do controle, que se mantiveram praticamente constantes ao longo do tempo. O desaparecimento gradativo das cadeias maiores da moléculas poderia sugerir atividade da enzima em termos da modificação do polímero, confirmando a ação da papaína no rompimento polimérico da quitosana.

A ação da enzima livre sobre a modificação enzimática do polímero apresenta estabilização da reação após 60 minutos, conforme indicado pelos perfis cromatográficos idênticos. Notou-se entretanto ascensão de concentração na região de menores massas molares, não acusado para enzima imobilizada.

A tabela abaixo resume os resultados das distribuições de massas molares médias para esta condição.

**Tabela 4.3 .** Distribuição de massas médias molares, calculados pelo software Millenium32, para a condição 1.

<b>Amostra</b>	<b>Mn</b>	<b>Mw</b>	<b>Mz</b>	<b>Mz+1</b>	<b>PD</b>
Quitosana 0	68.503±267	659.373±5.551	1.067.412±5.176	1.321.267±3079	9,63±0,04
<b>Controle</b>					
T= 0 min	134.529±1.293	683.202±1465	1.081.931±863	1.331.994±778	5,08±0,04
T=120 min	50.205±1.647	644.188±727	1.055.745±1.119	1.310.705±1.130	12,84±0,41
T= 240 min	72.611±2612	646.095±981	1.044.816±1.360	1.299.781±1.356	8,90±0,33
<b>Enzima Livre</b>					
T= 0 min	69.422±900	560.595±3.268	979.198±4.620	1.254.220±4.318	8,08±0,06
T=120 min	73.435±14.004	558.768±17.170	967.452±3.432	1.241.495±1.392	7,73±1,24
T= 240 min	57.565±22.700	525.494±34.430	949.276±8.767	1.227.600±3.162	9,77±3,25
<b>Enzima Imobilizada</b>					
T= 0 min	89.590±46.151	609.115±22.911	1.019.269±4.605	1.284.174±1.942	7,76±3,74
T=120 min	68.018±26.454	492.065±24.554	869.043±5.352	1.143.316±1.345	7,75±2,65
T= 240 min	76.527±7.477	452.568±917	792.125±5.011	1.059.910±6.677	5,94±0,57



Pela análise dos dados gerados pela integração dos cromatogramas, observa-se que os valores de  $M_z$  em cada ponto são menores para a reação com enzima imobilizada, quando comparados com a solução controle. Para a reação com enzima livre o decréscimo em  $M_z$  é mais suave, indicando que em termos da quebra de moléculas maiores a enzima imobilizada foi mais efetiva. Verifica-se uma redução de 30% para o valor de  $M_w$  (massa molar média ponderal) e, para a reação com enzima livre a redução é apenas sensivelmente maior do que a obtida para a solução controle. Observou-se que as massas molares médias mais influenciadas na solução reacional encontram-se na região de maior massa molar, e essa alteração não influencia a região de menores massas molares ( $M_n$ ).

Os resultados indicam que a ação da enzima perante o substrato, nesta condição, predomina na região de maiores massas molares, onde a redução é visível para ambos os tratamentos como pode ser observado na Tabela 4.4. Para o tratamento com enzima imobilizada a redução chega a 60% com relação ao controle, e alcançando 31% para tratamento com enzima livre.

**Tabela 4.4** – Percentagem de área correspondente aos intervalos das massas médias para condição 1.

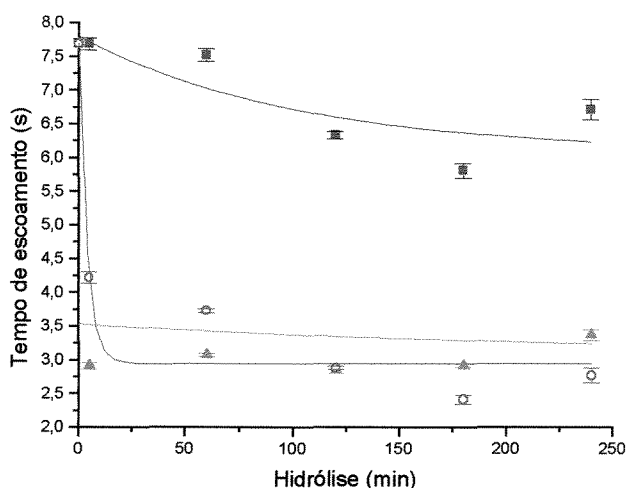
<b>Amostra</b>	<b>% acima de <math>10^6</math></b>	<b>% entre <math>10^6</math> e <math>4 \times 10^5</math></b>	<b>% entre <math>4 \times 10^5</math> e <math>1 \times 10^4</math></b>	<b>% abaixo de <math>10^4</math></b>
Quitossana	26,94±0,08	35,19±0,27	35,88±0,17	2,01±0,01
<b>Controle</b>				
T= 0 min	28,94±0,01	35,77±0,13	34,13±0,14	1,19±0,01
T=120 min	26,00±0,00	34,52±0,12	37,40±0,68	2,09±0,79
T= 240 min	25,78±0,14	35,75±0,74	36,47±0,61	2,00±0,00
<b>Enzima Livre</b>				
T= 0 min	20,07±0,34	35,94±3,06	40,76±2,77	3,25±0,07
T=120 min	19,47±0,70	34,95±0,44	42,57±0,33	2,98±0,83
T= 240 min	17,72±1,35	32,99±2,20	44,87±1,45	4,42±2,10
<b>Enzima Imobilizada</b>				
T= 0 min	22,85±1,62	36,10±0,14	38,72±0,06	2,33±1,43
T=120 min	13,78±0,79	34,82±1,87	48,19±0,93	3,24±1,72
T= 240 min	10,47±0,15	34,62±0,27	52,60±0,31	2,31±0,44

Observa-se na Tabela 4.4 que a redução da fração de polímeros de maior massa molar é acompanhada por um acréscimo progressivo na região III (entre 400.000 e 10.000) para a ação da enzima imobilizada, evidenciando que o ataque enzimático produziria polímeros de menor massa molar nesta região.

A ação da enzima livre é mais amena nesta condição de reação, como sugerem os dados comparados ao controle. Por outro lado, em termos da formação de polímeros com massa menor que  $10^4$ , a enzima livre apresentou maior atividade. A ação da papaína imobilizada foi considerada mais pronunciada do que a observada para a enzima livre, entretanto observou-se que a progressão da reação praticamente não influencia a distribuição de áreas abaixo de  $10^4$ .

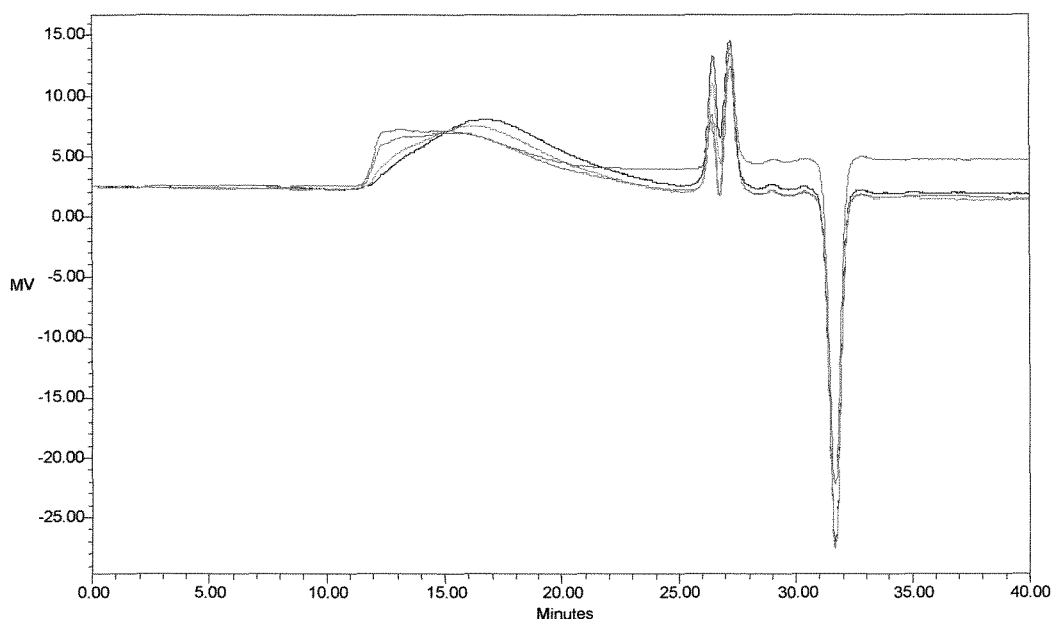
#### 4.3.2 – Condição 2: pH 4,3, T=54°C

Uma condição intermediária de pH foi avaliada com o objetivo de estudar o comportamento da enzima (tanto livre como imobilizada) cobrindo a faixa de pH estudada. Os resultados são apresentados a seguir.

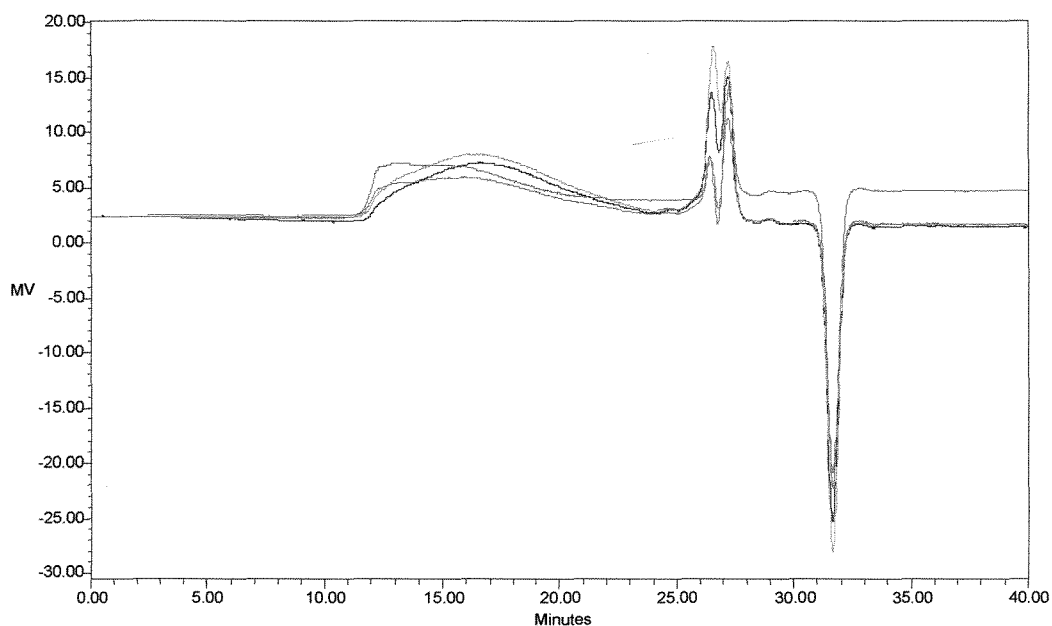


**Figura 4.9** – Tempo de escoamento de solução de hidrólise (10 g/l) pela papaína imobilizada em quitina (13 mg proteína/g quitina) (○) e pela papaína livre (▲), com concentração final de 0,45 g/l a 54°C e pH 4,3, com relação ao controle (■).

Verificou-se que a ação da enzima imobilizada frente ao substrato, para esta condição, se torna gradativamente mais pronunciada que a ação da enzima livre após 120 minutos, e após 240 minutos de reação a redução de tempo de escoamento atinge 64% para os ensaios com enzima imobilizada. Para o ensaio com enzima livre a redução de tempo de escoamento atinge 56%. É importante observar que para as amostras controle também observa-se redução de tempo de escoamento (da ordem de 13%), sugerindo que a hidrólise provocada pelo ataque ácido à molécula de quitosana não é desprezível.



**Figura 4.10** – Progressão temporal da hidrólise enzimática de quitosana com papaína imobilizada (0,45 g/l) a pH 4,3 e 54°C. (—) Quitosana; (—) t=0 min; (—) t=120 min; (—) t=240 min. Colunas Ultrahydrogel 1000 e 500 em série, fase móvel AcOH 0,33M/NaOH 0,1M, fluxo 0,8 ml/min, temperatura: 40°C. Detector índice de refração.



**Figura 4.11** – Progressão temporal da hidrólise enzimática de quitosana com papaína livre (0,45 g/l) a pH 4,3 e 54°C. (—) Quitosana; (—) t=0 min; (—) t=120 min; (—) t=240 min. Colunas Ultrahydrogel 1000 e 500 em série, fase móvel AcOH 0,33M/NaOH 0,1M, fluxo 0,8 ml/min, temperatura: 40°C. Detector índice de refração.

Pela análise do perfil dos cromatogramas, observou-se para a ambas as soluções reacionais a ação comparável da papaína no deslocamento dos picos para a região de menor massa molar em comparação ao perfil do controle.

A ação da enzima livre sobre a modificação enzimática do polímero foi estabilizada após 120 minutos, conforme indicado pelos perfis cromatográficos idênticos.

Para esta condição de reação observou-se o aumento da concentração na região externa à de detecção do polímero, correspondente ao tempo de retenção do monômero, para ambos tratamentos enzimáticos executados.

A tabela 4.5 apresenta os dados calculados para as distribuições de massas molares médias para esta condição.

**Tabela 4.5.** Distribuição de massas médias molares, calculados pelo software Millenium32, para a condição 2.

<b>Amostra</b>	<b>Mn</b>	<b>Mw</b>	<b>Mz</b>	<b>Mz+1</b>	<b>PD</b>
Quitosana	16.473±1.433	564.375±17.544	1.101.228±10.412	1.365.115±4.819	34,35±1,92
<b>Controle</b>					
T= 0 min	25.465±3.553	630.336±3.009	1.118.596±5.172	1.374.116±4.540	24,99±3,37
T=120 min	111.107±8.133	652.827±6.101	1.054.058±2.123	1.310.340±625	5,89±0,38
T=240 min	83.945±21.331	562.910±10.658	952.590±1.025	1.219.589±95	6,91±1,63
<b>Enzima Livre</b>					
T= 0 min	150.811±5.836	632.780±6.690	1.044.030±1.198	1.310.770±2.766	4,17±0,08
T=120 min	54.948±632	530.930±2.847	947.004±2.672	1.225.986±1.899	9,66±0,16
T=240 min	108.654±2.867	518.620±1.605	912.547±1.587	1.192.124±1.653	4,77±0,12
<b>Enzima Imobilizada</b>					
T= 0 min	71.160±15.462	651.336±1.991	1.076.088±4.830	1.334.174±3.082	9,38±2,07
T=120 min	136.905±5.172	574.893±1.103	944.921±2.485	1.212.015±2.305	4,20±0,17
T=240 min	118.450±5.793	496.989±6.356	838.444±7.788	1.102.817±9.022	4,20±0,15

Os dados gerados pela integração dos cromatogramas indicam que os valores de Mz em cada ponto são menores para a reação com enzima imobilizada, quando comparados com a solução controle. Para a reação com enzima livre o decréscimo em Mz é sensível, evidenciando que em termos da quebra de moléculas maiores, o tratamento com enzima imobilizada ainda foi mais efetivo do que o observado para tratamento com

enzima livre. Verificou-se uma redução inferior do valor de Mw para este caso em comparação à primeira condição (12% para enzima imobilizada, 8% para enzima livre).

Verificou-se novamente a redução da fração de maiores massas molares (acima de  $10^6$ ) para as soluções enzimáticas com respeito ao controle, como apontado na Tabela 4.6. Como visto anteriormente, a redução da fração de polímeros de maior massa molar é acompanhada por um acréscimo sensível na região III (entre 400.000 e 10.000) para a ação das enzimas.

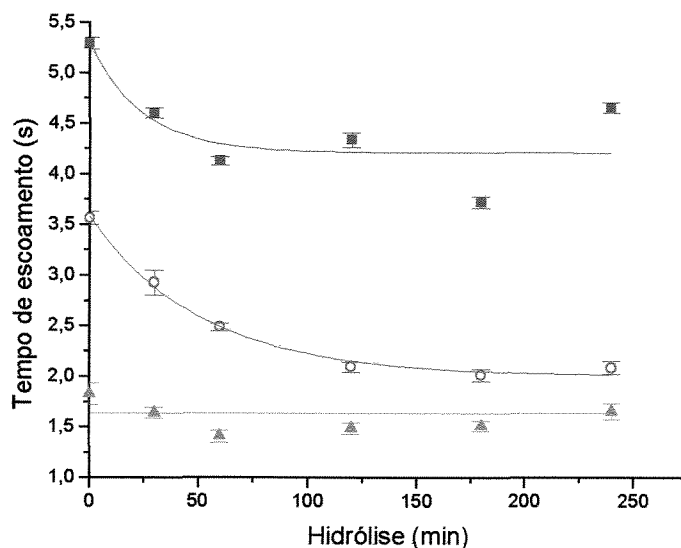
**Tabela 4.6** – Percentagem de área correspondente aos intervalos das massas médias para a condição 2.

Amostra	% acima de $10^6$	% entre $10^6$ e $4 \times 10^5$	% entre $4 \times 10^5$ e $1 \times 10^4$	% abaixo de $10^4$
Quitosana	24,31±0,60	27,45±1,51	37,56±2,32	10,67±0,22
<b>Controle</b>				
T= 0 min	27,92±0,12	29,49±0,34	36,08±0,55	6,51±0,78
T=120 min	25,26±0,25	38,67±3,07	34,45±3,08	1,62±0,24
T=240 min	17,71±0,78	37,27±0,32	42,73±0,37	2,29±0,74
<b>Enzima Livre</b>				
T= 0 min	23,48±0,97	36,30±1,82	39,25±0,68	0,97±0,17
T=120 min	17,49±0,12	33,48±0,18	45,20±0,34	3,83±0,05
T=240 min	15,90±0,1	33,21±0,38	49,07±0,52	1,83±0,24
<b>Enzima Imobilizada</b>				
T= 0 min	26,23±0,71	35,16±0,53	35,87±0,74	2,73±0,55
T=120 min	18,66±0,08	37,42±0,39	42,93±0,57	0,99±0,11
T=240 min	13,13±0,76	36,12±0,71	49,53±0,01	1,22±0,07

A ação da enzima imobilizada é mais amena nesta condição de reação e é praticamente equivalente aos resultados obtidos para os tratamentos com enzima livre como sugerem os dados acima. Observou-se que a progressão da reação praticamente não influencia a distribuição de áreas abaixo de  $10^4$ .

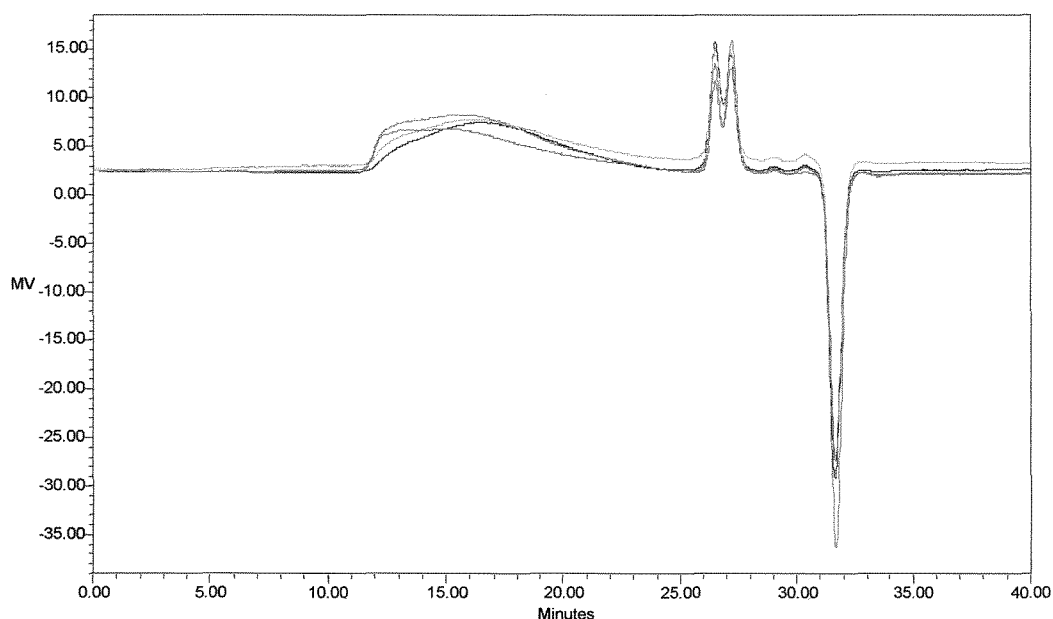
#### 4.3.3 – Condição 3: pH 5,3, T=54°C

Tendo em vista avaliar o comportamento da papaína comercial frente a condições de pH e temperatura próximos ao ótimo da enzima (condições fornecidas pela Prozyn), foi desenvolvido um novo teste de hidrólise nestas condições. Os resultados estão apresentados a seguir.

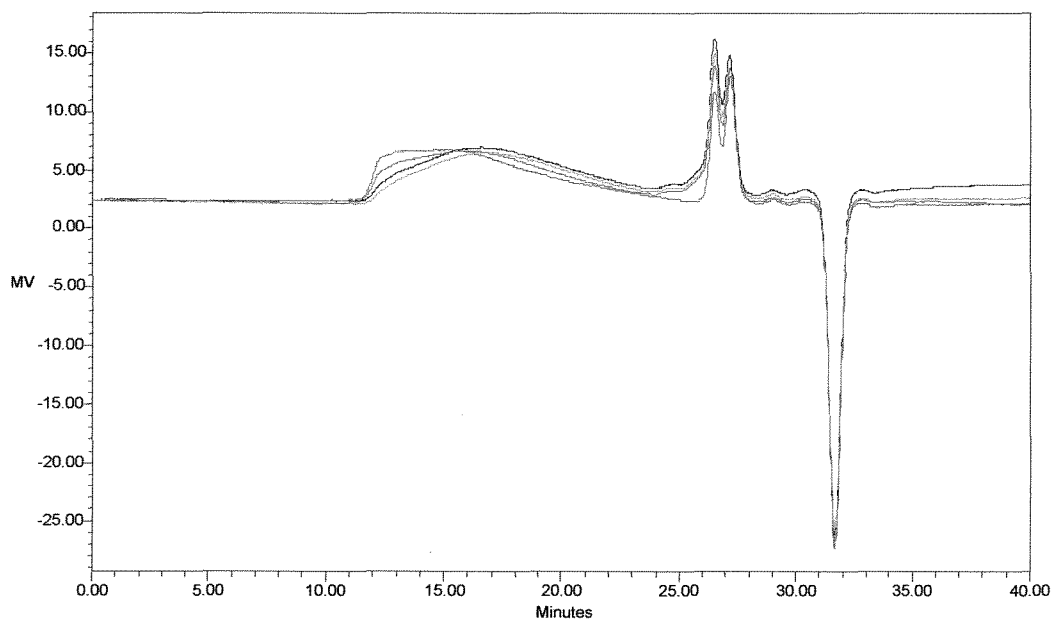


**Figura 4.12** – Tempo de escoamento de solução de hidrólise (10 g/l) pela papaína imobilizada em quitina (13 mg proteína/g quitina) (○) e pela papaína livre (▲), com concentração final de 0,45 g/l a 54°C e pH 5,3, com relação ao controle (■).

Para esta condição observa-se o efeito contrário do observado para a primeira condição, sendo a enzima livre mais ativa do que a imobilizada. Também nesta condição o efeito do ataque ácido à quitosana não é desprezível, atingindo até 18% de redução.



**Figura 4.13** – Progressão temporal da hidrólise enzimática de quitosana com papaína imobilizada (0,45 g/l) a pH 5,3 e 54°C. (—) Quitosana; (---) t=0 min; (---) t=120 min; (---) t=240 min. Colunas Ultrahydrogel 1000 e 500 em série, fase móvel AcOH 0,33M/NaOH 0,1M, fluxo 0,8 ml/min, temperatura: 40°C. Detector índice de refração.



**Figura 4.14** – Progressão temporal da hidrólise enzimática de quitosana com papaína livre (0,45 g/l) a pH 5,3 e 54°C. (—) Quitosana; (---) t=0 min; (---) t=120 min; (---) t=240 min. Colunas Ultrahydrogel 1000 e 500 em série, fase móvel AcOH 0,33M/NaOH 0,1M, fluxo 0,8 ml/min, temperatura: 40°C. Detector índice de refração.



Para esta condição a tendência observada pelos dados de tempo de escoamento se confirmam, sendo a ação da enzima livre mais efetiva do que os tratamentos com a enzima imobilizada. Pela análise do perfil dos cromatogramas, observou-se para a ambas as soluções reacionais a ação da papaína no deslocamento dos picos para a região de menor massa molar em comparação ao perfil do controle.

A ação da enzima livre sobre a modificação enzimática do polímero apresenta estabilização da reação após 120 minutos, conforme indicado pelos perfis cromatográficos idênticos. Observou-se o aumento progressivo da concentração na região externa à de detecção do polímero, correspondente ao tempo de retenção do monômero, para ambos tratamentos enzimáticos executados.

A tabela abaixo resume os resultados das distribuições de massas molares médias para esta condição.

**Tabela 4.7.** Distribuição de massas médias molares, calculados pelo software Millenium32, para a condição 3.

<b>Amostra</b>	<b>Mn</b>	<b>Mw</b>	<b>Mz</b>	<b>Mz+1</b>	<b>PD</b>
Quitosana	94.438±41.216	696.485±4.483	1.106.818±2.410	1.358.105±1.670	7,93±3,29
<b>Controle</b>					
T=0 min	118.478±10.982	690.334±13.500	1.101.942±2.565	1.351.868±77	5,85±0,43
T=120 min	122.205±16.598	652.835±28.368	1.051.512±16.848	1.306.889±11.524	5,38±0,50
T=240 min	113.527±14.013	647.726±25	1.047.045±8.620	1.302.211±7.328	5,75±0,71
<b>Enzima Livre</b>					
T=0 min	142.786±4.351	606.589±4.528	1.013.763±7.644	1.283.855±6.561	4,25±0,16
T=120 min	117.190±4.865	516.644±13.610	916.599±9.195	1.198.666±7.242	4,41±0,07
T=240 min	115.859±6.816	494.255±3.392	866.701±4.594	1.141.217±4.913	4,27±0,22
<b>Enzima Imobilizada</b>					
T=0 min	135.073±2.369	656.686±1.879	1.060.442±1.768	1.320.166±971	4,86±0,07
T=120 min	128.952±57.874	586.271±16.623	968.258±2.971	1.236.028±827	5,02±2,13
T=240 min	141.436±7.051	547.621±2.578	910.166±557	1.180.352±1.207	3,88±0,18

Os dados gerados pela integração dos cromatogramas indicam que os valores de Mz em cada ponto são menores para a reação com enzima livre, quando comparados com o resultado obtido para os tratamentos com enzima imobilizada. Nesta condição o decréscimo em Mz é maior para os tratamentos com enzima livre, invertendo-se a

tendência prevista para as condições anteriores. É observada também a redução dos valores de massa molar média ponderal ( $M_w$ ) para os tratamentos com enzima livre, chegando a valores de cerca de 24% de redução com relação ao controle.

**Tabela 4.8** – Percentagem de área correspondente aos intervalos das massas médias para condição 3.

<b>Amostra</b>	<b>% acima de <math>10^6</math></b>	<b>% entre <math>10^6</math> e <math>4 \times 10^5</math></b>	<b>% entre <math>4 \times 10^5</math> e <math>1 \times 10^4</math></b>	<b>% abaixo de <math>10^4</math></b>
Quitosana	29,41 $\pm$ 1,10	32,06 $\pm$ 0,35	36,20 $\pm$ 0,03	2,33 $\pm$ 0,78
<b>Controle</b>				
T= 0 min	28,85 $\pm$ 0,45	35,70 $\pm$ 1,00	33,88 $\pm$ 1,07	1,57 $\pm$ 0,38
T=120 min	25,28 $\pm$ 2,40	36,80 $\pm$ 0,24	36,37 $\pm$ 2,17	1,54 $\pm$ 0,47
T= 240 min	24,71 $\pm$ 0,31	37,01 $\pm$ 0,05	36,67 $\pm$ 0,00	1,61 $\pm$ 0,26
<b>Enzima Livre</b>				
T= 0 min	22,51 $\pm$ 0,56	33,22 $\pm$ 0,02	43,28 $\pm$ 0,66	1,00 $\pm$ 0,08
T=120 min	15,87 $\pm$ 0,85	32,93 $\pm$ 0,84	49,70 $\pm$ 0,30	1,50 $\pm$ 0,31
T= 240 min	13,55 $\pm$ 0,17	34,81 $\pm$ 0,13	50,01 $\pm$ 0,16	1,63 $\pm$ 0,47
<b>Enzima Imobilizada</b>				
T= 0 min	26,14 $\pm$ 0,34	36,09 $\pm$ 0,43	36,50 $\pm$ 0,17	1,27 $\pm$ 0,08
T=120 min	18,53 $\pm$ 0,13	37,83 $\pm$ 0,79	42,31 $\pm$ 0,21	1,34 $\pm$ 1,12
T= 240 min	16,57 $\pm$ 0,08	37,20 $\pm$ 0,23	45,42 $\pm$ 0,18	0,81 $\pm$ 0,13

Na comparação dos resultados verificou-se que os pesos médios mais influenciados na solução enzimática encontram-se na região de maior massa molar. Verificou-se, para estes dados, que há redução da fração mássica na região I para tratamentos com enzima livre, indicando que parte dos polímeros de maior massa molar presentes no controle foram quebrados pela ação da enzima sobre o substrato.

A ação da enzima imobilizada é mais amena nesta condição de reação, sendo a ação da enzima livre mais pronunciada como sugerem os dados acima. Observou-se que a progressão da reação praticamente não influencia a distribuição de áreas abaixo de  $10^4$ .

De acordo com os resultados apresentados, observa-se que, à medida que o pH da solução reacional é aumentado, menor é a atividade da enzima imobilizada. Este efeito é contrário à tendência natural da enzima livre, que é mais ativa a pH mais altos,

sugerindo que o processo de imobilização acarreta uma mudança nas condições ótimas de reação para a enzima.

Verificou-se tanto pelos dados de tempo de escoamento, quanto pelos cromatogramas gerados, que a diminuição do pH da solução reacional favoreceu a ação da enzima imobilizada com respeito aos tratamentos com enzima livre. Este fato sugere que o processo de imobilização alterou as condições ótimas da enzima em termos da hidrólise de quitosana.

Os resultados indicam que apesar das modificações ao nível da estrutura polimérica serem visíveis por CPGAE, estas foram consideradas suaves e por vezes não conclusivas, uma vez que o desvio observado entre algumas amostras tratadas e o controle foram mínimas.

**Tabela 4.9** – Efeito das condições de reação na atividade da papaína livre e imobilizada.

Condição	% Redução de Viscosidade (240 min)*		
	Enzima Livre	Enzima Imobilizada	Controle
pH 3,2 , T=50°	55%	70%	13%
pH 4,3 , T=54°	56%	64%	13%
pH 5,3 , T=54°	64%	55%	18%

\* relativa à viscosidade inicial da solução de quitosana para cada condição.

De acordo com MUZZARELLI *et al.* [1994], a ação da papaína imobilizada em quitina frente à solução de quitosana com grau de acetilação (GA) de 0,15 promove a redução de 88% da viscosidade após 180 min de reação a pH 3,2 e temperatura 50°C.

TERBOJEVICH *et al.* [1996] descreve que o ataque hidrolítico da papaína imobilizada sobre a quitosana (GA 0,23) promove a redução de 65% na viscosidade após 48 h de reação a 20°C, bem como a diminuição da massa molar da quitosana (GA 42%) em pelo menos uma ordem de magnitude para os tratamentos a 20°C, após 7 dias de ensaio. No entanto, a concentração de enzima utilizada nos ensaios de hidrólise não foi apresentada em nenhum dos dois trabalhos.

**Tabela 4.10** – Comparação com a literatura. NI – não informado.

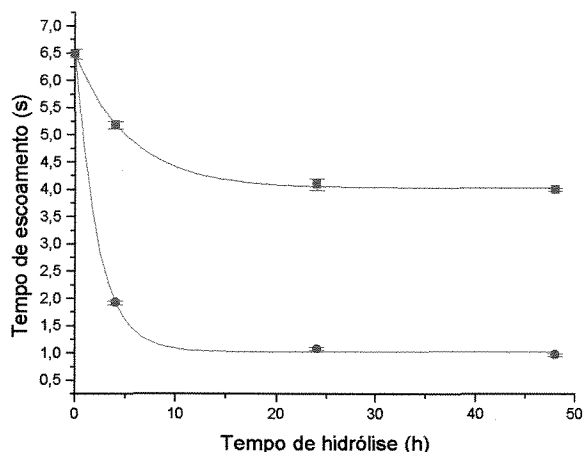
Condições de Reação	Redução de viscosidade	Mw do produto final	Referência
pH 3,2, T=50°C papaína imobilizada (10 mg/g quitina)	88% (treação=180 min)	NI	MUZZARELLI, 1994
pH 3,2, T=20°C papaína imobilizada (10 mg/g quitina)	65% redução após 48 h	201000 (após 7 dias)	TERBOJEVICH <i>et al.</i> , 1996
pH 3,2, T=50°C papaína imobilizada (12,5mg/g quitina)	85% redução após 48h	200167	<b>Este trabalho</b>

#### **4.4– Acompanhamento prolongado da melhor condição imobilizada**

A potencialização do efeito enzimático frente a um substrato pode ser alcançada de duas formas. Uma delas seria o aumento da concentração enzimática na solução, minimizando a relação enzima substrato, de modo a magnificar a modificação esperada em um mesmo intervalo de tempo. Esta alternativa traria um efeito operacional negativo pois, uma vez estando a enzima imobilizada em baixa concentração a um suporte, insere-se a dificuldade de agitação do sistema, proporcionando baixo rendimento com relação à recuperação das amostras.

Outra forma é proceder ao acompanhamento prolongado da hidrólise, mantendo-se a mesma relação enzima:substrato. Este também traria efeitos negativos devido à alta temperatura de reação, que poderia trazer efeitos de evaporação da solução reacional.

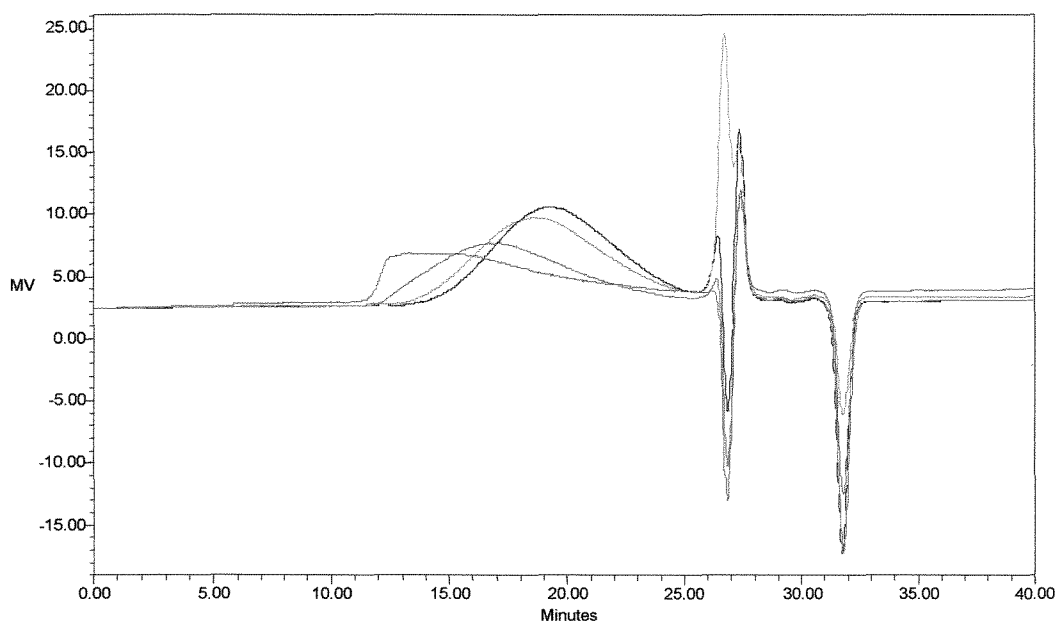
Tendo em vista obter resultados mais conclusivos com relação à modificação, procedeu-se ao acompanhamento prolongado da reação a pH 3,2 e 50°C, condição considerada melhor para tratamentos com enzimas imobilizadas. Os resultados obtidos para a ação na redução de viscosidade da solução reacional são apresentados na Figura 4.15.



**Figura 4.15** – Tempo de escoamento de solução de hidrólise (10 g/l) pela papaína imobilizada em quitina (13 mg proteína/g quitina) (●), com concentração final de 0,45 g/l a 50°C e pH 3,2, com relação ao controle (■).

Os dados de decréscimo do tempo de escoamento das soluções evidenciam que há estabilização da reação a partir de 24h de reação, chegando a 85% de redução com relação ao controle. A ação do ácido láctico proporciona uma redução de 38% após 48 h de reação.

Conforme obtido anteriormente, observou-se que, para a relação enzima substrato empregada, a estabilização da reação é obtida para aproximadamente 4h em termos do tempo de escoamento da solução. Por outro lado, pode-se observar que a estabilização não é decorrente de perda de atividade da enzima imobilizada, uma vez que o polímero é continuamente modificado no decorrer do período total. Os resultados obtidos para a análise em CPGAE são apresentados na Figura 4.16.



**Figura 4.16** – Progressão temporal da hidrólise enzimática de quitosana com papaína imobilizada (0,45 g/l) a pH 3,2 e 50°C. (—) Quitosana; (---) t= 4h; (····) t= 24h; (- · - ·) t= 48h. Colunas Ultrahydrogel 1000 e 500 em série, fase móvel AcOH 0,33M/NaOH 0,1M, fluxo 0,8 ml/min, temperatura: 40°C. Detector índice de refração.

A ação da enzima imobilizada proporciona um deslocamento progressivo do pico para a região de menores massas molares, seguida pela redução da polidispersão do polímero, gerando polímeros de distribuição de massa molar mais estreita. Os resultados inerentes à análise de CPGAE estão apresentados na tabela 4.9.

**Tabela 4.9** . . Distribuição de massas médias molares, calculados pelo software Millenium32, para o acompanhamento prolongado de hidrólise a pH 3,2 e T=50°C.

Amostra	Mn	Mw	Mz	Mz+1	PD
<b>Controle</b>					
Quitosana 0	30723	656410	1104020	1355724	21,37
T= 4h	107383	654418	1049500	1300176	6,09
T= 24h	89049	581761	963918	1223131	6,58
T= 48 h	45541	493321	865249	1126887	11,00
<b>Hidrólise – Enzima Imobilizada</b>					
T= 4h	53533	448834	800158	1064611	8,38
T= 24 h	47064	265743	490184	681159	5,66
T= 48h	28717	200167	390295	547556	6,97

Observa-se que a ação da enzima imobilizada frente ao substrato é verificada. Obteve-se para este experimento o deslocamento progressivo de todas as médias das massas molares para a região de menores massas molares, chegando a 52% de redução para a média  $M_z$ , com relação ao controle. O ataque enzimático às cadeias maiores da moléculas evidencia a atividade da enzima em termos da modificação do polímero.

**Tabela 4.10** – Percentagem de área correspondente aos intervalos das massas médias para o acompanhamento prolongado de reação com papaína imobilizada, a pH 3,2 e 50°C.

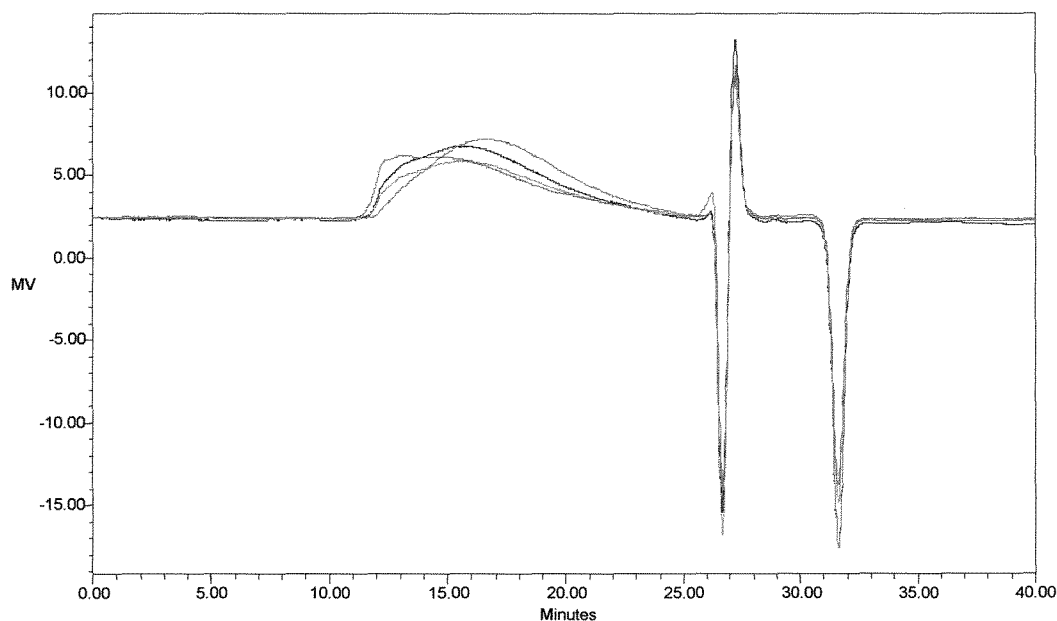
<b>Amostra</b>	<b>% acima De <math>10^6</math></b>	<b>% entre <math>10^6</math> e <math>4 \times 10^5</math></b>	<b>% entre <math>4 \times 10^5</math> e <math>1 \times 10^4</math></b>	<b>%abaixo de <math>10^4</math></b>
<b>Controle</b>				
Quitosana 0	28,00	33,00	34,84	1,49
T= 4h	25,54	36,77	36,20	1,49
T= 24h	19,00	37,81	41,10	2,10
T= 48 h	13,30	35,78	47,46	3,46
<b>Hidrólise – Enzima Imobilizada</b>				
T= 4h	10,6	34,1	62,20	3,70
T= 24 h	1,71	21,41	74,26	4,33
T= 48h	0,00	14,26	78,68	7,32

Os dados de distribuição cumulativa para este ensaio indicam a ação da enzima maioritariamente sobre a região de maior massa molar e, após 24h, sobre a região de massas molares médias. Adicionalmente, observa-se o aumento progressivo das regiões subsequentes, ocasionando a geração de polímeros cuja distribuição é mais estreita e oligômeros, envolvidos na região IV da análise.

#### 4.5 – Teste de reaproveitamento do catalisador

Uma das principais propriedades atribuídas à utilização de enzimas imobilizadas em processos industriais é a sua capacidade de reutilização, minimizando custos operacionais inerentes a processos enzimáticos via enzima livre.

Tendo em vista avaliar a performance da enzima imobilizada em termos da reutilização desta no processo de modificação do polímero quitosana, procedeu-se ao acompanhamento da hidrólise em três ciclos de operação de 4 horas. Os resultados obtidos por CPGAE estão apresentados a seguir.



**Figura 4.17** – Análise de ciclos de reaproveitamento do suporte (0,45 g/l) em turnos de 4 horas, a pH 3,2 e 50°C. (—) Quitosana; (---) 1º Ciclo; (····) 2º Ciclo; (- · - ·) 3º Ciclo. Colunas Ultrahydrogel 1000 e 500 em série, fase móvel AcOH 0,33M/NaOH 0,1M, fluxo 0,8 ml/min, temperatura: 40°C.

Detector índice de refração.

Pela análise dos perfis cromatográficos obtidos, observa-se o decréscimo da atividade da enzima imobilizada em termos de sua reutilização. A atividade obtida para o primeiro ciclo não é alcançada no segundo ciclo, o que conseqüentemente denota redução de atividade da enzima devido ao processo de reutilização.



Como demonstrado na tabela 4.11, no primeiro ciclo obtém-se uma redução de 20% com respeito ao valor de  $M_z$  na performance de atividade. Para o segundo ciclo, porém, observa-se para o mesmo critério redução de apenas 5%, ocasionando redução de 75% na atividade da enzima. Por outro lado, observa-se uma tendência de decréscimo nos valores relativos a  $M_n$ .

Tabela 4.11. . Distribuição de massas médias molares, calculados pelo software Millenium32, para o acompanhamento de ciclos de operação, turnos de 4h, pH 3,2 e 50°C.

Amostra	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	PD
<b>Controle</b>						
Quitosana 0	93.519	647.357	619.981	1.048.556	1.303.949	6,92
<b>Hidrólise – Enzima Imobilizada</b>						
1º turno	54.331	474.500	464.876	841.471	1.112.435	8,74
2º turno	45.226	596.964	622.374	998.469	1.245.527	13,21
3º turno	29.430	556.549	608.754	991.543	1.259.858	21,67

Os dados apresentados na Tabela 4.12 indicam a redução da atividade do catalisador pela análise da queda de percentagem obtida para a Região I. Enquanto o primeiro turno apresenta redução de mais 50% na fração mássica da região após 4h, para os ciclos subsequentes esta redução é de apenas 16% e 22%, respectivamente.

**Tabela 4.12** - Percentagem de área correspondente aos intervalos das massas médias para o acompanhamento de ciclos de operação, turnos de 4h, pH 3,2 e 50°C.

Amostra	% acima de $10^6$	% entre $10^6$ e $4 \times 10^5$	% entre $4 \times 10^5$ e $1 \times 10^4$	%abaixo de $10^4$
<b>Controle</b>				
Quitosana 0	26,03±0,77	35,59±0,62	36,57±0,33	1,82±1,06
<b>Hidrólise – Enzima Imobilizada</b>				
1º turno	12,47±0,33	23,92±0,33	59,59±0,25	4,01±0,25
2º turno	21,88±0,15	36,67±1,22	38,95±0,77	2,50±0,59
3º turno	20,27±0,11	33,71±1,48	39,90±0,19	6,12±1,57

O processo de redução de atividade da enzima imobilizada para os testes de reutilização pode ter origem nas condições operacionais do processo. Entre um e outro

ciclo de reação, o suporte foi submetido à centrifugação para retirada da solução reacional, lavagem e reutilização. As centrifugações repetidas do suporte poderiam causar danos à superfície do catalisador, ocasionando perda de atividade.

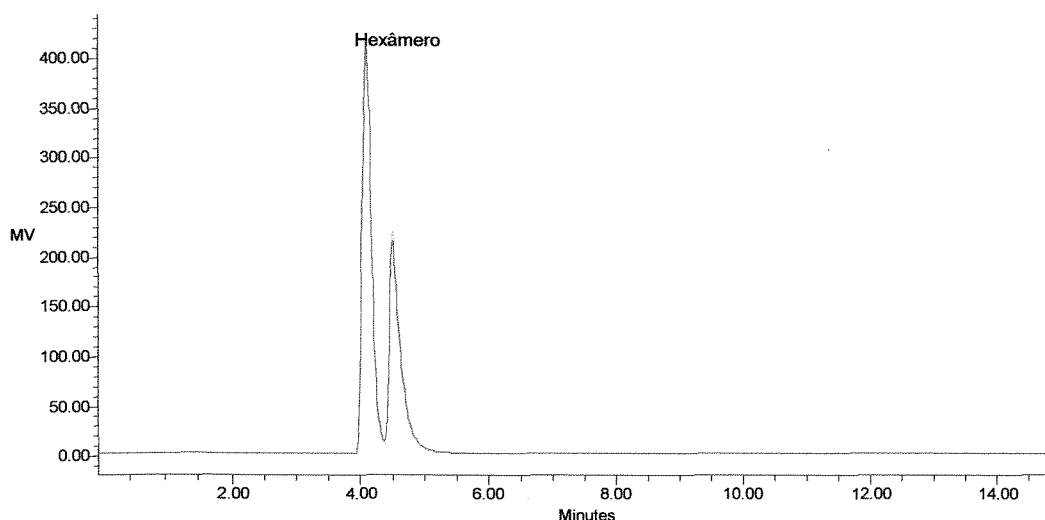
A redução da atividade observada poderia ser minimizada adicionando-se uma etapa de ativação anterior ao reprocesso do suporte. De acordo com CHIYOU *et al.* [1987], a papaína é lábil ao ar e pode vir a ser inativada em presença de oxigênio dissolvido originado naturalmente no processo de agitação da solução reacional. Sugere-se, portanto, que seja anexado um passo de ativação da enzima suportada com cisteína 1mM antes da reutilização na reação.

## CAPÍTULO 5

## PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS

## 5.1 – Produção de oligossacarídeos de quitosana

Com o objetivo de se avaliar o potencial da papaína imobilizada frente ao substrato quitosana em termos da produção de oligômeros menores (da ordem de 1-10 unidades monoméricas, o estudo de hidrólise foi desenvolvido a pH 3,2 e 50°C. Os resultados para estes ensaios estão apresentados a seguir.



**Figura 5.1** – Hidrólise de quitosana (10 g/l) por papaína imobilizada (—). (0,45 g/l), a 50°C e pH 3,2, por 48 horas, com relação ao controle (—). Acompanhamento da concentração de hexâmero de quitosana: detecção por CLAE. Condições: coluna uBondapak NH<sub>2</sub> (3,9 mm x 30 cm), fase móvel acetonitrila : água 50:50 (v/v) (solução B) em fluxo isocrático linear, fluxo 0,8 ml/min. Detetor índice de refração.

A análise dos perfis dos cromatogramas indica que a ação da papaína imobilizada sobre a quitosana não produz oligômeros menores mesmo sob condições prolongadas de tempo de exposição com respeito às amostras controle.

## 5.2– Produção de oligossacarídeos de quitina

O potencial hidrolítico de quitinase de *Trichoderma spp T-6*, com atividade 1,08 U/ml, foi avaliado em planejamento experimental 2<sup>2</sup>, cujas condições são apresentadas a seguir.

**Tabela 5.1** – Planejamento experimental 2<sup>2</sup>

Variáveis	-1	0	+1
PH	4,7	5,2	5,7
T (°C)	32	37	42

A reação foi acompanhada por 3 horas, e os resultados em termos do rendimento da reação quanto à produção de oligômeros (dados de HPLC) estão relacionados a seguir.

**Tabela 5.2** – Hidrólise de quitina coloidal (0,5%) por quitinase fúngica (10,8 mU/ml) nas condições de planejamento experimental. Detecção de oligômeros por CLAE. Condições: coluna  $\mu$ Bondapak NH<sub>2</sub> (3,9 mm x 30 cm), fase móvel acetonitrila : água 70:30 (v/v) (solução A) e 50:50 (v/v) (solução B) em gradiente linear, fluxo 0,8 ml/min. Detetor Waters UV 486.

Condições			Rendimento (%)				
Experimento	pH	T (°C)	Monômero	Dímero	Trímero	Tetrâmero	TOTAL
1	4,7(-1)	32 (-1)	0,47	4,47	1,43	ND	6,37
2	5,7(+1)	32 (-1)	ND	0,49	ND	1,73	2,22
3	4,7(-1)	42 (+1)	ND	1,45	1,25	ND	2,70
4	5,7(+1)	42 (+1)	5,45	0,42	ND	1,63	7,50
5 (C)	5,2 (0)	37 (0)	18,57	ND	ND	ND	18,57
6 (C)	5,2 (0)	37 (0)	16,34	ND	ND	ND	16,34

ND = não detectado

Devido à evolução diferenciada de oligômeros para cada condição, não foi possível avaliar estatisticamente as condições ótimas de produção destes.

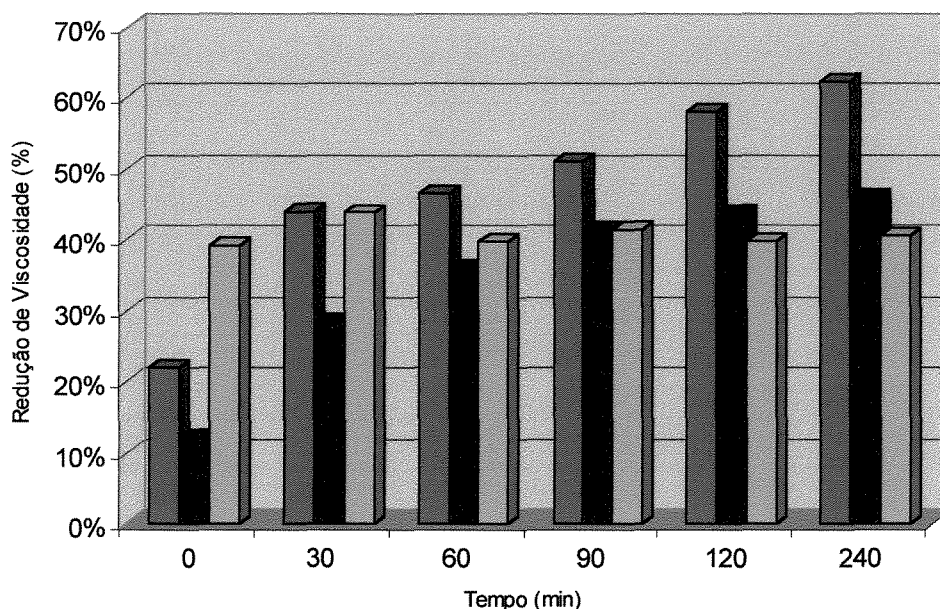
Observa-se que ação da quitinase fúngica sobre a quitina coloidal apresenta comportamentos diferentes conforme a condição avaliada. Uma vez que fungos do gênero *Trichoderma* são conhecidamente grandes produtores de enzimas, é possível que a ação da mistura sobre a quitina coloidal apresente respostas diferentes frente às condições de reação.

## CAPÍTULO 6

## IMOBILIZAÇÃO DA PAPAÍNA

**6.1 – Efeito da carga enzimática na atividade catalítica**

Com o objetivo de investigar o efeito da enzima imobilizada frente a quitosana em função da carga de enzima aplicada ao suporte, estudo de hidrólise utilizando três cargas de enzima diferentes (13, 54 e 64 mg proteína/g quitina) de enzima foram desenvolvidos. A comparação dos resultados está apresentada a seguir.



**Figura 6.1** – Redução de viscosidade (%) para hidrólise de quitosana (10 g/l) utilizando enzima imobilizada em três cargas diferentes: (■) 13 mg proteína/ g quitina, (■) 54 mg proteína/g quitina; (□) 64 mg proteína/g quitina. Condições de hidrólise: pH 3,2, T=50°C.

Observa-se, para a condição de maior carga de enzima, que redução de 40% na viscosidade da solução ocorre prontamente. Entretanto, este fator permanece praticamente constante ao longo do tempo. Para a condição intermediária a hidrólise evolui mais gradativamente. A melhor condição é aquela onde a carga de enzima aplicada é menor.

Sugere-se que este fato possa estar relacionado à maneira pela qual a enzima se liga ao suporte. Na primeira etapa da imobilização, a enzima foi aplicada ao suporte e mantida em contato com a quitina. A adição de glutaraldeído promove ligações cruzadas entre grupos aminados. A utilização de uma grande carga de enzima neste processo pode ter levado à constituição de camadas múltiplas na superfície do suporte, impossibilitando a ação da enzima adsorvida nas camadas mais internas.

Observou-se também que efeito da massa de enzima imobilizada também pode ter influência sobre a efetividade da reação. Para a condição de menor carga, mantendo-se constante a concentração de enzima em reação, houve uma maior utilização de massa do complexo que nas outras condições, proporcionando um aumento da superfície de contato disponível para a reação catalítica.

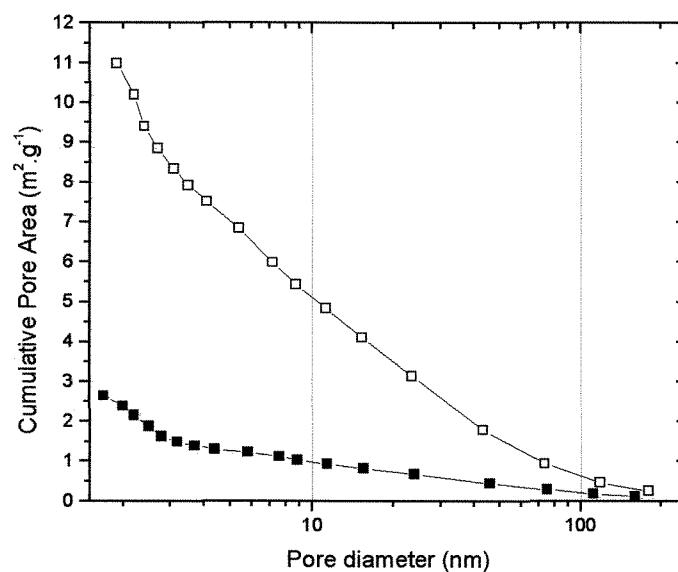
## 6.2 – Caracterização das superfícies – Fisissorção

Quitina e quitina com papaína suportada (13 mg proteína/g quitina) foram submetidas à caracterização de área superficial, e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 5.1.

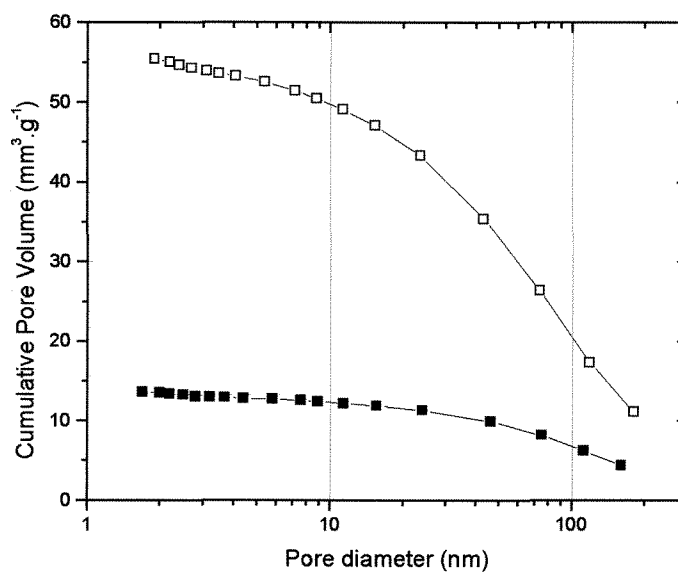
**Tabela 6.1** – Caracterização das superfícies do suporte obtidos pela análise de fisissorção.

	<b>Área superficial</b>	<b>Volume de poros</b>
	<b>(m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>(cm<sup>3</sup>/g)</b>
Quitina	11,50	56,28
Quitina:papaína	3,23	19,13

O comprometimento da área do suporte após imobilização pode ser observado nas Figuras 6.1 e 6.2. De acordo com os gráficos cumulativos, observa-se que a adição da papaína à superfície, seguida da reação de ligações cruzadas com glutaraldeído, proporciona uma redução de área superficial de 8,5 m<sup>2</sup> (77%). Em termos do volume dos poros observa-se redução da ordem de 66% com relação à quitina. O processo de imobilização da papaína sobre o suporte origina uma nova superfície, agora “ativa” para a reação enzimática, que ocorrerá mediante o contato com o substrato dentro ou fora dos poros.



**Figura 6.2** – Distribuição cumulativa de área superficial dos materiais □ quitina; ■ complexo quitina:papaína (13 mg proteína/g quitina). Dados de fisissorção.



**Figura 6.3** – Distribuição cumulativa de volume dos materiais □ quitina; ■ complexo quitina:papaína (13 mg proteína/g quitina). Dados de fisissorção.

**Tabela 6.2 – Distribuição de tamanho de poros dos suportes. Dados de fisssorção de N<sub>2</sub>.**

	Macroporos (acima de 50 nm)	Mesoporos (50 – 10 nm)	Microporos (abaixo de 10 nm)
Quitina	8,64	40,75	56,13
Quitina: papaína	10,65	24,33	65,00

Observa-se pela Tabela 6.2 que a faixa de distribuição de tamanho de poros estudado é reduzido na região de mesoporos pela imobilização da enzima ao suporte.

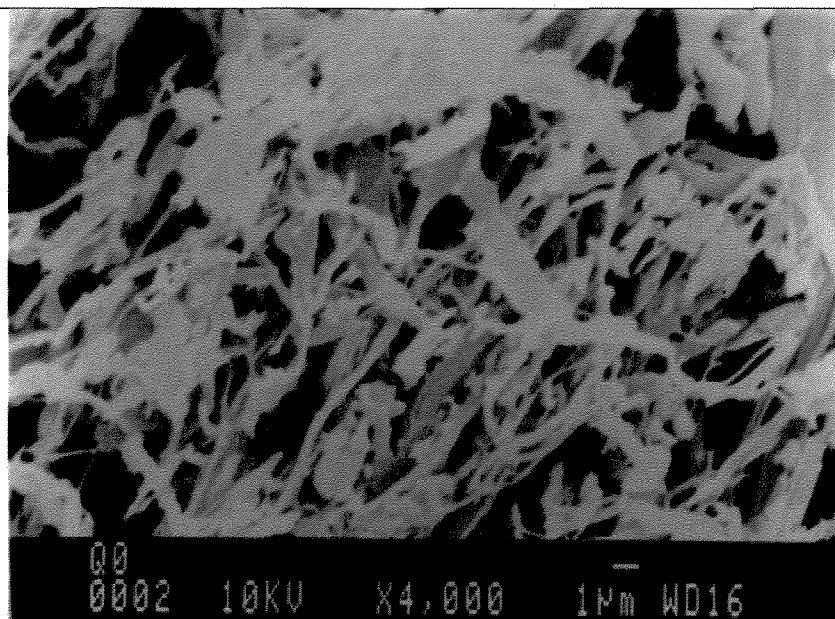
Devido à natureza poliônica e heterogênea das quitosanas, é difícil precisar o volume hidrodinâmico que o substrato ocuparia em solução, e este seria um parâmetro de grande relevância na determinação dos mecanismos de reação no sistema estudado.

Segundo Roberts [1980], quitosanas de diferentes procedências foram avaliadas quanto ao parâmetro  $dn/dc$  (uma expressão do volume molar) obtidos por espalhamento de luz. Observou-se que este parâmetro variou entre 0,160 e 0,180  $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ . Tomando estes dados como estimativa de dimensão da quitosana em solução, observa-se que este é cerca de 100 vezes menor do que o obtido para a volume de poros do suporte após imobilização. Entretanto é sabido que nem todos os poros estarão disponíveis para a difusão e reação, uma vez que o suporte apresenta uma distribuição de poros.

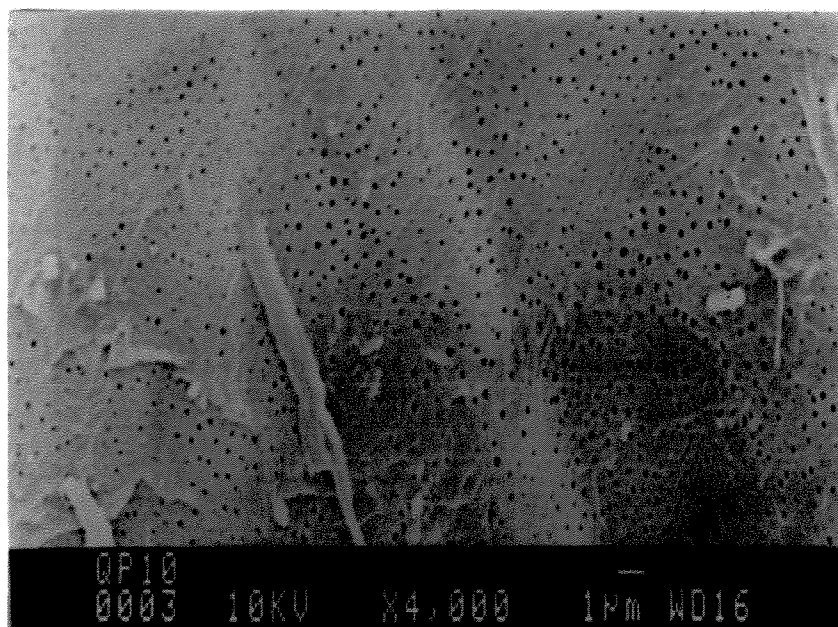
### 6.3 – Análise superficial do suporte – MEV

Tendo em vista a determinação da estrutura do suporte antes e após a imobilização, quitina e o complexo quitina: papaína foram submetidos à análise de superfície por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As Figuras 6.4 e 6.5 apresentam os resultados obtidos.





**Figura 6.4** – Superfície da quitina livre por Microscopia Eletrônica de Varredura (JEOL). Aumento de 4000 vezes.



**Figura 6.5** – MEV para o complexo quitina: papaína, concentração 13 mg proteína/g quitina. Aumento de 4000 vezes.

Observa-se nas figuras acima que a quitina em estado natural apresenta-se como uma rede fibrosa, com uma distribuição de poros aparentemente heterogêneo, de acordo com a Figura 6.4. Após a reação com a enzima e posterior ligação com glutaraldeído, o

suporte torna-se altamente compactado e homogêneo, e são originados poros de diâmetro bem definidos, da ordem de 0,1  $\mu\text{m}$  como mostra a Figura 6.5.

#### 6.4 – Efeitos da Transferência de Massa no sistema reacional

O transporte de massa através dos poros do suporte é dependente do volume hidrodinâmico da quitosana em solução. Se  $V_{\text{poro}} \gg V_{\text{hquitosana}}$ , e este volume é suficientemente grande para o livre transporte da quitosana através dos poros, então o efeito de partição do soluto toma lugar, seguido de reação nos poros. A mesma aproximação é válida para os produtos da reação.

De acordo com ARNON (1977), a papaína em solução tem uma forma esferóide, de dimensões 36X48X36 Å. Considerando-se a distribuição de tamanho de poros para a quitina apresentada na Tabela 6.2, sugere-se que a enzima tenha acesso à parte dos poros do suporte, o que seria sustentado pela redução do volume de poros quando da adição da enzima ao suporte.

Se consideramos que os poros das partículas nas colunas de GPC possuem diâmetro médio de 1000 Å, e a massa de corte para este sistema em particular é de  $1 \times 10^6$ , apenas uma fração das moléculas maiores do que  $10^6$  seriam totalmente excluídas e reagiriam na superfície da enzima imobilizada. Por sua vez, para diâmetros de poro médio de 50 nm o volume de exclusão é de  $4 \times 10^5$ . Se usarmos a mesma aproximação e considerando que a distribuição dos poros do suporte se estende na faixa entre 2-280 nm após a imobilização da enzima, é plausível admitir que parte da quitosana em solução tem acesso aos poros do suporte. É necessário salientar que a natureza das superfícies e condições comparadas são distintas, mas podem ser usadas como aproximação na análise do sistema reacional.

Como pôde ser observado na seção 4.3, sugere-se que a papaína apresenta especificidade diferente para as formas livre e imobilizada. Após um pequeno grau de hidrólise nas mesmas condições, os dados apresentados por CPGAE mostraram que a ação da enzima imobilizada se mostrou mais efetiva na quebra de polímeros de maior massa molar, produzindo polímeros de menor massa molar e reduzindo sua polidispersão, o que não foi evidenciado para tratamentos com enzima livre para as mesmas condições. Dados

de viscosimetria mostraram um decaimento rápido da viscosidade da solução reacional para tratamentos com enzima livre, enquanto a ação da enzima imobilizada apresentou efetividade semelhante apenas após 2h de reação.

### **6.5 – Hipóteses sobre a transferência de massa no sistema reacional**

Com respeito à ação da enzima imobilizada no sistema reacional, podem ser delineadas algumas hipóteses:

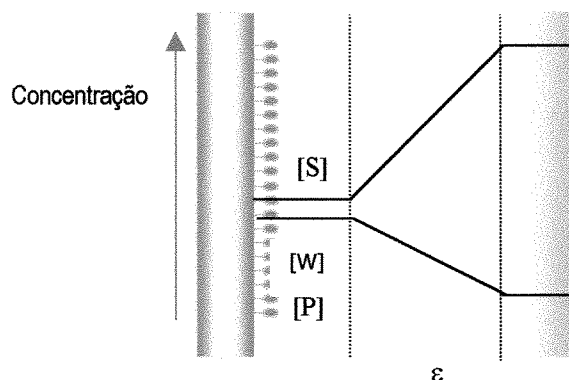
1) No início, a reação ocorre apenas na superfície do suporte, quebrando polímeros de maior massa molar que supostamente não difundiriam pelos poros devido a impedimento estérico. À medida que a hidrólise progride e os produtos se formam em polímeros de menor massa molar (e, portanto, com volume hidrodinâmico menor), estes tonam-se hábeis para difundirem através dos poros, fazendo com que a papaína imobilizada através dos poros esteja disponível para a reação;

2) O decréscimo tardio da viscosidade nesta condição é relacionado a efeitos de entumescimento do suporte em solução, uma vez que estes são colocados na forma sólida no meio reacional.

### **6.6 – Relações de Transporte de Massa – Aproximação de Maxwell-Stefan**

#### **1º Caso – MODELO NÃO ESTRUTURADO – reação na superfície externa do suporte**

Neste caso, a reação enzimática ocorreria apenas na superfície do suporte. Tal hipótese seria válida na condição onde o substrato seria incapacitado de alcançar as regiões mais internas do suporte, onde moléculas de papaína também estariam acopladas. Efeito direto desta aproximação seria a perda de atividade aparente em comparação com a enzima livre, uma vez que as enzima imobilizada internamente aos poros do suporte não estariam disponíveis para a reação. Neste caso, difusão externa e reação na interface ocorrem consecutivamente.



Onde [S] é o substrato quitosana (numerado por 1), [P] é o produto (numerado por 2) e [W] é o diluyente (ácido láctico, numerado por 3). A região  $\varepsilon$  delimita a interface filme - seio do fluido.

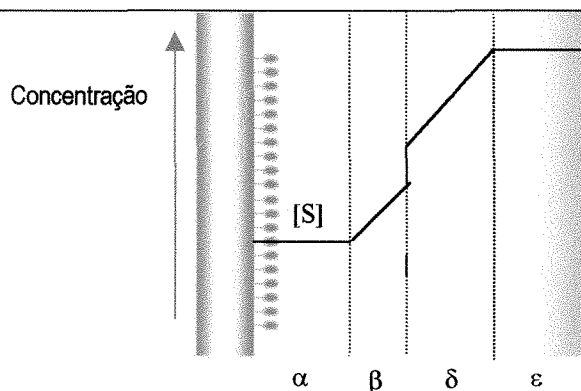
$$\text{Relação de consistência} \rightarrow N_1 = \frac{N_2}{v} \text{ (relação estequiométrica)}$$

$$\text{Relações de transporte} \rightarrow \Delta X_1 = \frac{\bar{x}_2 N_1 - \bar{x}_1 N_2}{k_{12} \bar{C}} + \frac{\bar{x}_3 N_1 - \bar{x}_1 N_3}{k_{13} \bar{C}}$$

$$\Delta X_2 = \frac{\bar{x}_1 N_2 - \bar{x}_2 N_1}{k_{12} \bar{C}} + \frac{\bar{x}_3 N_2 - \bar{x}_2 N_3}{k_{23} \bar{C}}$$

## 2º Caso – reação na superfície externa do suporte + reação interna à superfície porosa

A reação poderia ocorrer tanto na superfície externa como interna ao suporte, originando a partição dos solutos ao longo da interface sólido líquido. Neste caso o substrato seria hábil para difundir e reagir tanto na superfície do suporte como internamente aos poros. Há de se considerar a resistência à difusão na interface sólido-líquido como a resistência causada por uma membrana.



Onde [S] é o substrato quitosana (numerado por 1), [P] é o produto (numerado por 2) e [W] é o diluente (ácido láctico, numerado por 3). A região  $\alpha$  delimita a porção diretamente em contato com a enzima; a região  $\beta$  é designada pelo transporte intra-poro,  $\delta$  é a região na entrada do poro (onde ocorre a partição do soluto), e  $\epsilon$  delimita a interface filme - seio do fluido.

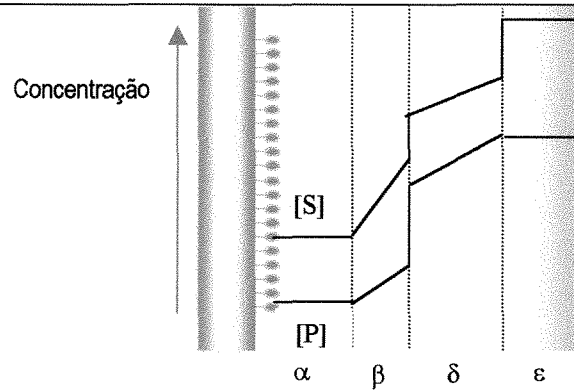
$$\text{Relação de consistência} \rightarrow N_1 = \frac{N_2}{v}$$

$$\text{Relações de transporte} \rightarrow \Delta X_1 = \frac{\bar{x}_2 N_1 - \bar{x}_1 N_2}{k_{12} \bar{c}} + \frac{\bar{x}_3 N_1 - \bar{x}_1 N_3}{k_{13} \bar{c}} + \frac{N_1}{k_{1M} \bar{c}}$$

$$\Delta X_2 = \frac{\bar{x}_1 N_2 - \bar{x}_2 N_1}{k_{12} \bar{c}} + \frac{\bar{x}_3 N_2 - \bar{x}_2 N_3}{k_{23} \bar{c}} + \frac{N_2}{k_{2M} \bar{c}}$$

### 3º Caso: Alta viscosidade da solução reacional

Neste caso, a reação poderia ocorrer tanto na superfície externa como interna ao suporte, originando a partição dos solutos ao longo da interface sólido-líquido, entretanto, há uma resistência adicional relativa ao transporte de massa através do filme devido à alta viscosidade do substrato. Há de se considerar, além da resistência à difusão na interface sólido-líquido, a resistência causada pela interface filme:seio do fluido, como relacionado abaixo.



Onde [S] é o substrato quitosana (numerado por 1), [P] é o produto (numerado por 2) e [W] é o diluente (ácido láctico, numerado por 3). A região  $\alpha$  delimita a porção diretamente em contato com a enzima; a região  $\beta$  é designada pelo transporte intra-poro,  $\delta$  é a região na entrada do poro (onde ocorre a partição do soluto entre o sólido e o fluido), e  $\varepsilon$  delimita a interface filme - seio do fluido (onde ocorre a partição dos solutos entre a interface e o seio do fluido devido à alta viscosidade da solução).

$$\text{Relação de consistência} \rightarrow N_1 = \frac{N_2}{v} \quad (\text{relação estequiométrica})$$

Relações de transporte  $\rightarrow$

$$\Delta X_1 \lambda = X_1 \varepsilon - X_1 \delta = \frac{\bar{x}_2 N_1 - \bar{x}_1 N_2}{k_{12} c} + \frac{\bar{x}_3 N_1 - \bar{x}_1 N_3}{k_{13} c} + \frac{N_1}{K_{1M} \cdot c} + \frac{N_1}{k_{1M}(\lambda) c}$$

$$\Delta X_1 \varphi = X_1 \alpha - X_1 \beta = \frac{\bar{x}_2 N_1 - \bar{x}_1 N_2}{k_{12} c} + \frac{\bar{x}_3 N_1 - \bar{x}_1 N_3}{k_{13} c} + \frac{N_1}{k_{1M} c} + \frac{N_1}{k_{1M}(\lambda) c}$$

Sugere-se que a determinação dos parâmetros cinéticos para a ação da enzima imobilizada forneçam indicativos se o sistema reacional sofre influência dos efeitos difusionais.

**CAPÍTULO 7****CONCLUSÕES**

Em termos da modificação enzimática de quitosana:

- Verificou-se para todas as condições que a ação da enzima livre frente à quitosana é pronunciada, atingindo a estabilização da viscosidade em um curto espaço de tempo. Para a enzima imobilizada, porém, a redução da viscosidade é gradativa, atingindo estabilização mais tardiamente.
- A melhor condição para a ação da papaína imobilizada foram as de pH 3,2 e T=50°C. Esta condição promoveu maior modificação polimérica, obtendo-se polímeros com Mw =200.000 após 48h de reação (contra Mw=660.000 para a solução original). Entretanto, a ação da papaína imobilizada não promoveu a produção de oligômeros menores de quitosana com respeito ao controle, sugerindo que a ação majoritária está na quebra de polímeros, gerando polímeros de massas molares menores, reduzindo a polidispersão.
- Atividade da enzima imobilizada foi detectada para 48h de reação, entretanto, a reutilização do suporte em ciclos de 4 horas promoveu a redução progressiva da atividade catalítica.

Em termos da modificação enzimática de quitina:

- A ação hidrolítica da quitinase fúngica frente à solução de quitina coloidal é diferenciada para as diferentes condições estudadas pelo planejamento estatístico. A condição central (pH 5,2, T=37°C) proporcionou rendimento médio de 17% em D-glucosamina após 3 horas de reação.

Em termos da imobilização de papaína:

- Observou-se que a ação da papaína imobilizada é favorecida frente ao substrato para a menor carga de enzima aplicada ao substrato, devido provavelmente à fatores estéricos.

- 
- O processo de imobilização de papaína à quitina e crosslinking promoveu a redução de área superficial em 77%, e redução de 66% no volume de poros, comparados ao suporte natural. Sugeriu-se que a papaína teria habilidade de difundir-se e acoplar-se internamente aos poros, gerando uma superfície compacta e ativa para a hidrólise.



## **CAPÍTULO 8**

### **PRÓXIMAS ETAPAS**

Como próximas etapas do projeto, pode-se apontar:

- Estudo da melhor relação massa de enzima imobilizada : substrato, de forma a acelerar a cinética de reação de hidrólise da quitosana;
- Padronização de método de determinação de massa molar por viscosidade, utilizando viscosímetros padronizados;
- Planejamento experimental visando a produção de quitosanas modificadas;
- Investigar a influência do grau de acetilação da quitosana na atividade da papaína imobilizada;
- Imobilização de papaína em suportes sintéticos.

## CAPÍTULO 7

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIBA, S. Preparation of *N*-acetylchitooligosaccharides from lysozymic hydrolysates of partially *N*-acetylated chitosans. **Carbohydrate Research**, 261: 297-306. **1994**.
- AIBA, S. Preparation of *N*-acetylchitooligosaccharides by hydrolysis of chitosan with chitinase followed by *N*-acetylation. **Carbohydrate Research**, 265: 323-328. **1994**.
- ARNON, R. Papain, vol. XIX: 226-244. In: **Methods of Enzymology**, eds Perlmann, G., Lorand, L. Academic Press, NY, **1970**.
- BADER, H. J.; BIRKHOLZ, E. Teaching chitin chemistry. p 507-519 In **"Chitin Handbook"**, eds Muzzarelli, R.A.A. e Peter, M.G. European Chitin Society, **1997**.
- BERI, R. G.; WALKER, J.; REESE, E. T.; ROLLINGS, J. E. Characterization of chitosans via coupled size exclusion chromatography and multiple-angle laser light-scattering technique. **Carbohydrate Research**, 238: 11-26, **1993**.
- BLUMBERG, S.; SCHRECHTER, I.; BERGER, A. The purification of papain by affinity chromatography. **European Journal of Biochemistry** 15: 97-102, **1970**.
- BOSSO, C.; DEFAYE, J.; DOMARD, A.; GADELLE, A. The behavior of chitin towards anhydrous hydrogen fluoride. Preparation of  $\beta$ -(1-4)-linked 2-acetamido-D-deoxy-D-glucopyranosyl oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, 156:57-68, **1986**.
- BOUCHER, I.; DUPUY, A.; VIDAL, P.; NEUGEBAUER, W.A.; BRZEZINSKI, R. Purification and characterization of a chitosanase from *Streptomyces* N174. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 38: 188 – 193, **1992**.
- CHAPLIN, M.F.; BUCKE, C. **Enzyme Technology**. Cambridge University Press, **1990**.
- CHEN, J. P.; LEE, M. S. Enhanced production of *Serratia marcescens* chitinase on PEG/dextran aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, 17: 1021-1027, **1995**.

- CHIOU, R. Y-Y.; BEUCHAT, L.R. Immobilization of papain on an anion exchange resin by physical adsorption followed by cross-linking with glutaraldehyde. **Journal of Food Biochemistry**, 11: 163-173, **1987**.
- CHUPA, J. M., FOSTER, A. M., SUMMER, S. R.; MADIHALLY, S. V.; MATTHEW, H. W. T. Vascular cell responses to polysaccharide materials: in vitro and in vivo evaluations. **Biomaterials**, 21:2315 – 2322, **2000**.
- CHURMS, S. C. Modern Size-Exclusion Chromatography of Carbohydrates and Glycoconjugates. In: Carbohydrate Analysis – high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. Ed. Ziad El Rassi. **Journal of Chromatography** library, vol. 58. Elsevier Science, **1995**.
- DELBEN, F.; STEFANICH, S.; MUZZARELLI, R. A. A. Chelating ability and enzymatic hydrolysis of water- soluble chitosans. **Carbohydrate Polymers**, 19:17-23, **1992**.
- DIXON, M. WEBB, E. C. Enzymes. Longman Group Ltd, New York, 1979.
- DODANE, V.; KHAN, M. A.; MERVIN, J. R. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. **International Journal of Pharmaceutics**, 182:21 – 32, **1999**.
- FENTON, D. M.; EVELEIGH, D. E. Purification and mode of action of a chitosanase from *Penicillium islandicum*. **Journal of General Microbiology**, 126: 151-165, **1981**.
- FINLEY, J.W.; STANLEY, W.L., WATTERS, G.G. Removal of chill haze from beer with papain immobilized on chitin. **Biotechnology and Bioengineering**, 19: 1895-1897, **1977**.
- FISCHER, L. Gel filtration chromatography. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology (gen. ed. Work, T.S.; Burdon, R.H.), 2º edição. Elsevier, Amsterdam, 1990.
- HASEGAWA, M.; ISOGAI, A.; ONABE, F. Preparation of low molecular weight chitosan using phosphoric acid. **Carbohydrate Polymers**, 20:279-283, **1993**.
- HE, P.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Chitosan microspheres prepared by spray drying. **International Journal of Pharmaceutics**, 187: 53 – 65, **1999**.
- HIRANO, S.; ZHANG, M.; NAKAGAWA, M.; MIYATA, T. Wet spun chitosan-collagen fibers, their chemical N-modifications and blood compatibility. **Biomaterials** 21:997-1003, **2000**.

- HOROWITZ, S.T.; ROSEMAN, S.; BLUMENTHAL, H.J. The Preparation of Glucosamine Oligossacharides. I - Separation. **Journal of American Chemistry Society**, 79: 5046-5049, **1957**.
- IKEHATA, K.; NICELL, J. A. Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenol. **Bioresource Technology**, 74: 191 – 199, **2000**.
- ILYINA, A.V.; TATARINOVA, N. Y.; VARLAMOV, V. P. The preparation of low-molecular weight chitosan using chitinolytic complex from *Streptomyces kursanovii*. **Process Biochemistry**, 34: 875-878, **1999**.
- IZUME, M.; OHTAKARA, A. Preparation of D-glucosamine oligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan. **Agricultural and Biological Chemistry**, 51(4): 1189-1191, **1987**.
- IZUME, M.; NAGAE, S.I.; KAWAGISHI, H.; OHTAKARA, A. Preparation of N-acetylchitooligosaccharides from enzymatic hidrolysates of chitosan. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 56(8):1327-1328, **1992**.
- JEON, Y.; KIM, S. Continuous production of chitooligosaccharides using a dual reactor system. **Process Biochemistry**, 35(6): 623-632, **2000**.
- JEON, Y.; KIM, S. Production of chitooligosaccharides using a ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. **Carbohydrate Polymers**, 41:133-141, **2000**.
- KATO, Y.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Evaluation of n-succinyl-chitosan as a systemic long-circulating polymer. **Biomaterials**, 21:1579 – 1585, **2000**.
- KRAJEWSKA, B. Chitin and derivatives as supports for immobilization of enzymes. **Acta Biotechnologica** 11(3), 269 – 277, **1991**.
- KUMAR, G.; BRISTOW, J.F.; SMITH, P.J.; PAYNE, G.F. Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan. **Polymer** 41:2157-2168, **2000**.
- KURITA, K. Chemistry and application of chitin and chitosan. **Polymer Degradation and Stability** 59:117-120, **1998**.
- KURITA, K.; KAJI Y.; MORI, T.; NISHIYAMA Y. Enzymatic degradation of  $\beta$ -chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. **Carbohydrate Polymers** 42:19–21, **2000**.

- LEE, M-Y; VAR, F.; SHIN-YA, Y. KAJIUCHI, T.; YANG, J-W. Optimum conditions for the precipitation of chitosan oligomers with DP 5 – 7 in concentrated acid at low temperature. **Process Biochemistry**, 34:493 – 500, **1999**.
- LILLO, L.E.; MATSUSHIRO, B. Chemical modifications of carboxylated chitosans. **Carbohydrate Polymers** 34:397-401, **1997**.
- MINAMI, S.; MASUDA, M.; SUZUKI, H.; OKAMOTO, Y.; MATSUHASHI, A.; KATO, K.; SHIGEMASA, Y. Subcutaneous injected chitosan induces systemic activation in dogs. **Carbohydrate Polymers** 33: 285-294. **1997**.
- MURAKI, E. ; YAKU, F.; KOJIMA, H. Preparation and crystallization of D – glucosamine oligosaccharides with DP 6 –8. **Carbohydrate Research**, 239: 227-237, **1993**.
- MUZZARELLI, R.A.A; LOUGH, C.; EMANUELLI, M. The molecular weight of chitosans studied by laser-scattering. **Carbohydrate Research** 164:433-442, **1987**.
- MUZZARELLI, R. A. A. Biochemical significance of exogenous chitins and chitosans in animals and patients. **Carbohydrate Polymers**, 20: 7-16, **1993**.
- MUZZARELLI, R. A. A.; TOMASETTI, M.; ILARI, P. Depolymerization of chitosan with the aid of papain. **Enzyme and Microbial Technology**, 16:110-114, **1994**.
- MUZZARELLI, R. A. A.; XIA, W.; TOMASETTI, M; ILARI, P. Depolymerization of chitosan and substituted chitosans with the aid of wheat germ lipase preparation. **Enzyme and Microbial Technology**, 17: 541-545, **1995**.
- NIOLA, F.; BASORA, N.; CHORNET, E.; VIDAL, P.F. A rapid method for the determination of the degree of N-acetylation of chitin-chitosan samples by acid hydrolysis and HPLC. **Carbohydrate Research** 238:1-9, **1993**.
- NISHIMURA, S-I.; NISHI, N; TOKURA, S. Inhibition of the hydrolytic activity of thrombin by chitin heparinoids. **Carbohydrate Research**, 156: 286-292. **1986**.
- OLSEN,R, SCHWARTZMILLER, D; WEPPNER, W; WINANDY, R. Biomedical applications of chitin and its derivatives. p:813-828. In **"Chitin and Chitosan, Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications"**. eds. Skjak-Braek, G; Anthonsen, T e Sandford, P. Elsevier Applied Science, Londres, **1988**.

- ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Biodegradation and distribution of water – soluble chitosan in mice. **Biomaterials**, 20:175 – 182, **1999**.
- PANTALEONE, D., YALPANI, M. SCOLLAR, M. Unusual susceptibility of chitosan to enzymic hydrolysis. **Carbohydrate Research**, 237: 325-332, **1992**.
- PELLETIER A., SYGUSCH J. Purification and characterization of three chitosanase activities from *Bacillus megaterim* P1. **Applied and Environmental Microbiology**, 56: 844-848, **1990**.
- PIZA, F.A.T., SILOTO, A.M.P.; CARVALHO, C.V e FRANCO, T.T. Production, Characterization and purification of chitosanase from *Bacillus cereus* . **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, **1999**.
- REDDY, M. V. B.; BELKACEMI, K; CORCUFF, R.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infectin by *Bothrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, 20: 39 – 51, **2000**.
- REGE, JP. R.; BLOCK, L.H. Chitosan Processing: influence of process parameters during acidic and alkaline hydrolysis and effect of the processing sequence on the resultant chitosan's properties. **Carbohydrate Research** 321: 235-245, **1999**.
- RIBEIRO, A. P. S. Produção de Quitinases por Fermentação por *Trichoderma sp.* Tese de mestrado. Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, **1999**.
- ROBERTS, G. A. F. Determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan. p 127-133. In "**Chitin Handbook**", eds Muzzarelli, R.A.A. e Peter, M.G. European Chitin Society, **1997**.
- RODRIGUES, N. R. Desenvolvimento analítico e determinação da distribuição de pesos moleculares do galactomanano de sementes de *Dimorphandra mollis* por cromatografia de permeação em gel. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, **1997**.
- RUEL – GARIÉPY, E.; CHENITE, A.; CHAPUT, C.; GUIRGUIS, S.; LEROUX, J-C. Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, 203: 89 – 98, **2000**.
- RUPLEY, J.A. The hydrolysis of chitin by concentrated HCl and the preparation of low-molecular weight substrates for lisozyme. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.83, 245-255, **1964**.

- SAKAI, K.; UCHIYAMA, T.; MATAHIRA, Y.; NANJO, F. Immobilization of Chitinolytic Enzymes and Continuous Production of N-Acetylglucosamine with the Immobilized Enzymes. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 72 (3): 168-172, **1991**.
- SCHRÖDER, E., MÜLLER, G., ARNDT, K-L. Polymer Characterization. 2º edição Oxford University Press, 1989.
- ŞENEL, S.; IKINCI, G.; YOUSEFI-RAD, A.; SARGON, M.F.; HINCAL, A. A. Chitosan films and hydrogels of clorexidine gluconate for oral mucosal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, 193: 197 – 203, **2000**.
- SEDMAN, J. J.; GROSSBERG, S. E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. **Analytical Biochemistry**, 79: 544 – 552, **1977**.
- SHAHIDI, F.; ARADICHCHI, J. K.V.; JEON, Y-J. Food applications of chitins and chitosans. **Trends in Food Science & Technology** 10:37-51, **1999**.
- SHAIKH, S. A.; DESHPANDE, M.V. Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 9:468–475, **1993**.
- SLUYTERMAN, L.A.Æ. The activation reaction of papain. **Biochimica et Biophysica Acta** 139:430-438, **1967**.
- STANLEY, W.L.; WATTERS, G.G., CHAN, B.; MERCER, J.M. Lactase and other enzymes bound on chitin with glutaraldehyde. **Biotechnology and Bioengineering**, 17, 315 – 326, **1975**.
- STOYACHENKO, I.A ; VARLAMOV, V.P. DAVANKOV, V.A. Chitinases of *Streptomyces kusanovii*: purification and some properties. **Carbohydrate Polymers**, 24:47-54, **1994**.
- TERBOJEVICH, M.; COSANI, A.; FOCHER, B.; MARSANO, E. High performance gel-permeation chromatography of chitosan samples. **Carbohydrate Research**, 250: 301-314, **1993**.
- TERBOJEVICH, M.; COSANI, A. MUZZARELLI, R. A. A. Molecular parameters of chitosans depolymerized with the aid of papain. **Carbohydrate Polymers**, 29: 63-68, **1996**.

- TISCHER, W.; KASCHE, V. Immobilized enzymes: crystals or carriers? Trends in Biotechnology, 17:326 – 340, 1999.
- TSIGOS, I.; MARTINO, A.; KAFETZOPOULOS, D.; BOURIOTIS, V. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. **Trends in Biotechnology**, 18: 305 – 312, **2000**.
- USAMI, Y.; MINAMI, S.; OKAMOTO, Y.; MATSUHASHI, A.; KATO, K.; SHIGEMASA, Y. Influence of chain length of N-acetyl – D-glucosamine and D-glucosamine residues on direct and complement-mediated chemotactic activities for canine polymorphonuclear cells. **Carbohydrate Polymers** 32: 115-122, **1997**.
- VÅRUM, K. M.; HOLME, H. K.; IZUME, M.; STOKKE, B. T.; SMIDSRØD, O. Determination of enzymatic hydrolysis specificity of partially N-acetylated chitosans. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1291: 5-15, **1996**.
- YALPANI, M.; PANTALEONE, D. An examination of the unusual susceptibilities of aminoglycans to enzymatic hydrolysis. **Carbohydrate Research**, 256: 159 – 175 , **1994**.
- ZHANG, H.; DU, Y.; YU, X.; MITSUTOMI, M.; AIBA, S. Preparation of chitooligosaccharides from chitosan by a complex enzyme. **Carbohydrate Research**, 320, 257-260, **1999**.
- ZHANG, M.; HIRANO, S. Novel N-unsaturated fatty acyl and N-trimethylacetyl derivatives of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v.26, p. 205-209, **1995**.



**Anexo 10.1 – Artigo submetido ao 3<sup>rd</sup>. International Symposium on Chitin Enzymology and 4<sup>th</sup>. Conference of the European Chitin Society, 6 – 10 Maio, 2001.**

---

## ENZYMATIC MODIFICATION OF CHITOSAN BY FREE AND IMMOBILISED PAPAIN

Grigolon<sup>§</sup> L.B., Azevedo, A., Santos, R. R., Franco<sup>°</sup>, T.T.

Faculty of Chemical Engineering, Process Development Dept., UNICAMP, Campinas, Brazil

<sup>§</sup> [lisanne@feq.unicamp.br](mailto:lisanne@feq.unicamp.br), <sup>°</sup> [franco@feq.unicamp.br](mailto:franco@feq.unicamp.br)

### INTRODUCTION

Chitosan modification can be provided by the use of specific hydrolases (as chitosanases and chitinases) or by means of other enzymes, like papain, trypsin and amylase. Immobilisation of enzymes enables multiple reuse of enzymes for continuous operation and rapid termination of reaction.

The scope of this work is to investigate enzymatic modification of chitosan in order to produce low molar mass polymers and chitoooligomers with the aid of free and immobilised papain.

### MATERIALS

**Chitin and Chitosan** – Chitin (lot nº 68H-7014, Sigma) was used as support for immobilisation. Chitosan of deacetylation degree (DD) 80 % was provided by Padetec (Parque de Desenvolvimento Tecnológico do Ceará, Brazil), Papain (from *Carica papaya*, lot nº B-80091700) was provided by Prozym Industries (São Paulo, Brazil) with activity 45,900 USP mg<sup>-1</sup>.

**Enzyme immobilisation** – Papain immobilisation was carried out according to Finley et al. (1977). Chitin powder (15g, 0.35 – 0.5 mm) was suspended in phosphate buffer (100 ml, 0.1 M, pH 7.6). Papain (660 mg, 0.35 mg protein/ mg solids) was dissolved in the following solution (10 ml): cysteine 50 mM, EDTA 50 mM, mercaptoethanol 1 µM. Papain solution was added to the chitin suspension and kept in a refrigerator at 4°C and 30 minutes. Then glutaraldehyde (1 ml, 10 %) was added and the suspension was kept under mild stirring overnight. The chitin – papain complex was filtered and introduced into a 3 M NaCl solution for two hours, washed with deionized water and dried at 50 °C. Protein

balances were carried out using Coomassie Blue method (Sedmak and Grossberg, 1977).

**Support characterisation** – Powdered chitin (0.35 – 0.5 mm diameter) and chitin:papain complex were dried under vacuum at 70°C for 6 h. Approximately 250 mg of solid materials were then placed in a Micromeritics ASAP 2000 surface area analyser (Micromeritics, Norcross, GA), and nitrogen adsorption isotherms were run at 77K. From these isotherms, micro, meso and macropore volumes were calculated.

**Scanning Electron Microscopy (SEM)** – Chitin (natural and cross-linked with papain) were coated with Au-Pd blend under high vacuum. Coated samples were examined using a Jeol electron scanning microscopy.

**Hydrolysis experiments** – Chitosan (10 g/l) was dissolved in 1 % lactic acid adjusted at two different pHs, 3.2 and 5.3. Modification experiments were carried out at two different temperature conditions, 50 and 54°C in a 40 ml temperature-controlled batch reactor. Free and immobilised papain (final concentration 0.45 g/l) were added to the reactor and aliquots were taken and centrifuged to remove solid material.

**Viscosimetric measurements** – Viscosity of hydrolysis samples was determined at 30°C in a 1-ml pipette from time measurement of 0.5-ml sample flow through the pipette. Measurements were repeated 10 times in order to obtain experimental deviation. Viscosity alterations were calculated as follows:

$$\% \text{ Reduction} = \frac{T_C - T_E}{T_C} \times 100$$

where  $T_E$  is the 0.5-ml flow (in seconds) of hydrolysis samples and  $T_C$  corresponds to 0.5-ml flow (in seconds) of control solutions.

**Gel permeation chromatography** – A chromatographic system consisting of Ultrahydrogel columns 1000 and 500 (7.8x300 mm, in series), a 515 HPLC pump Waters automatic injector type 717 plus and a refractive index detector 410 were used, all from Waters, USA. Mobile phase was AcOH 0.33M/ NaOH 0.1M, pH 3.9 at 40°C. Eluent and polymer solutions were filtered through 0.45  $\mu$ m Millipore filters. Polymer concentration was 1.0 mg/ml, the injected volume 0.2 ml and flow was 0.8 ml/min. Calibration was performed by means of dextran standards (Sigma, range of molar masses:  $2 \times 10^6$  through  $9.4 \times 10^3$  g mol<sup>-1</sup>), plus D-glucosamine HCl standard (molar mass 212 g.mol<sup>-1</sup>).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Immobilisation data

As obtained from surface analysis data, powdered chitin has surface area of  $11.56 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ , and after papain immobilization the surface area was reduced to  $3.05 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ . Figure 1 shows that chitin has the majority of its area distributed in the microporous region, smaller than 10 nm.

It is known from crystallographic data [Arnon, 1977] that papain possesses an ellipsoidal shape with rough dimensions ( $37 \times 37 \times 50 \text{ \AA}$ ). Its spherical diameter in solution was calculated to be  $36 \text{ \AA}$  from partial specific volume data. Considering this order of magnitude, it can be suggested that enzyme immobilisation is about to happen both at the surface and into the pores of the support.

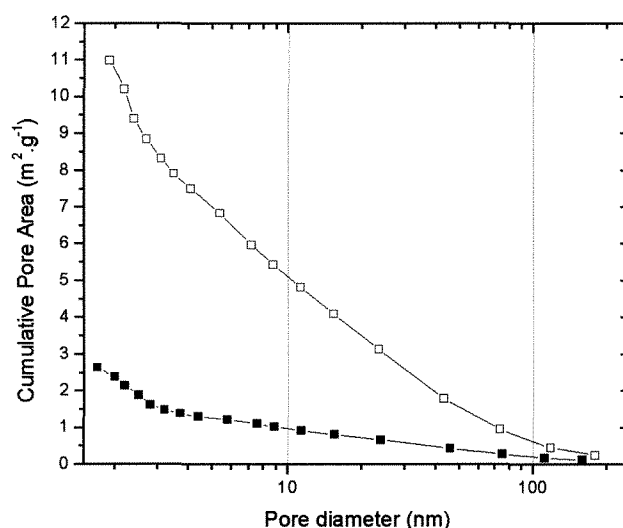
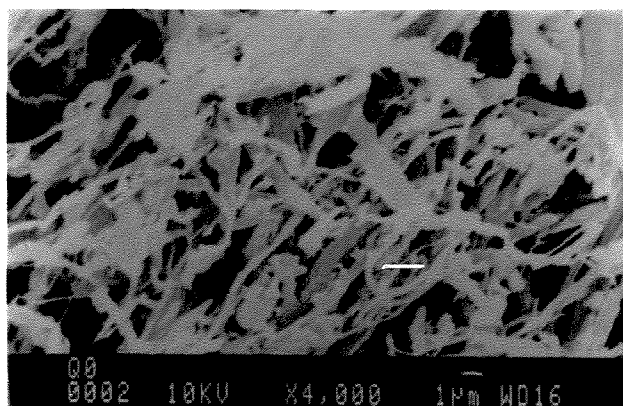


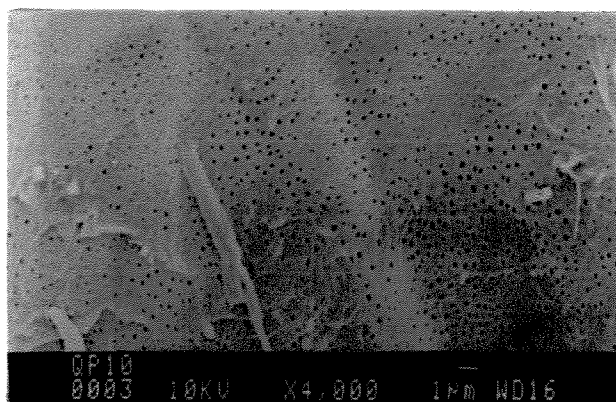
Figure 1. Cumulative pore area distribution data. (□) free chitin; (■) chitin:papain complex, 13 mg protein. (g chitin)<sup>-1</sup>.

The effect of cross linking and enzyme immobilisation onto the fibers highly affects the reduction of surface area of the support, as can be observed from SEM photomicrographs. Natural chitin presents a disorganised fibrous structure, with interfiber

spaces of variable size (Figure 2a). Cross-linked chitin, however, shows a more “compact” structure, with regions of extreme organisation leading to the formation of real small pores (Figure 2b). It is suggested that enzyme immobilization onto fibers and crosslinking lead to the formation of another contact surface, that has to be available for hydrolysis process.



(A)



(B)

Figure 2. SEM micrographs. A) chitin, B)chitin:papain complex.

### Hydrolysis experiments

Viscosimetric data of chitosan hydrolysates are shown in Figures 3a and 3b. The curves show that free papain achieved higher activity towards chitosan in reaction conditions next to its optimum, at pH 5.3 and temperature 54°C, leading to a viscosity decrease of 64 % after 4h-treatment compared to control solution (against 55 % for immobilised enzyme treatments). On the other hand, immobilised enzyme assays showed higher activity at acidic conditions (pH 3.2 and T=50°C), as shown in Figure , leading to 72

% viscosity decrease after 4h-reaction. The data suggest that the immobilisation technique employed shifted the enzyme optimum conditions.

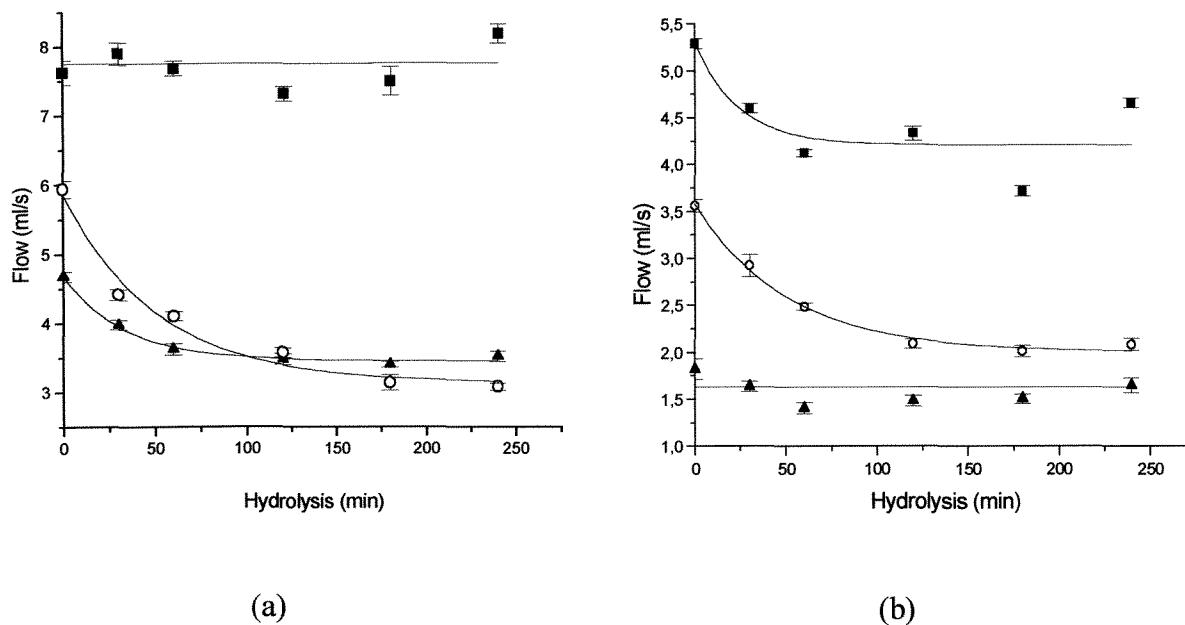


Figure 3 – Viscosimetric profiles with time of chitosan ( $10 \text{ g.l}^{-1}$ ) in the presence of free ( $\blacktriangle$ ) and immobilised ( $\circ$ ) papain ( $0.45 \text{ g.l}^{-1}$ ) in lactate solution at (a) pH 3.2,  $50^\circ\text{C}$ ; (b) pH 5.3,  $54^\circ\text{C}$ . ( $\blacksquare$ ) control solution (enzyme absent).

### Chromatographic profiles of papain-treated chitosan

For immobilised enzyme treatments, chitosan chains with higher molar mass were more susceptible to hydrolytic attack. After 24 h, only 1.5 % of total polymer injected is related to chains with molar mass above  $10^6 \text{ g mol}^{-1}$  (against 27 % present on original solution), leading to total absence of polymer molar mass above  $10^6 \text{ g mol}^{-1}$  after 48 h reaction. Kinetic evolution of molecular modification of chitosan are presented in Figure 4.

For free enzyme treatments, the lower molar mass chains were readily modified by papain, leading to a more marked decrease in  $M_n$  rather than  $M_z$  or  $M_{z+1}$ , which remains almost constant after 4 h reaction, as can be seen in Figure 5. In addition, it is observed the progressive evolution of lower molar mass compounds in these samples, suggesting that the free papain-promoted hydrolysis produced oligomers of chitosan. Control solutions also showed a slight change in position and shape due to acidic hydrolysis during the 48-hour study period.

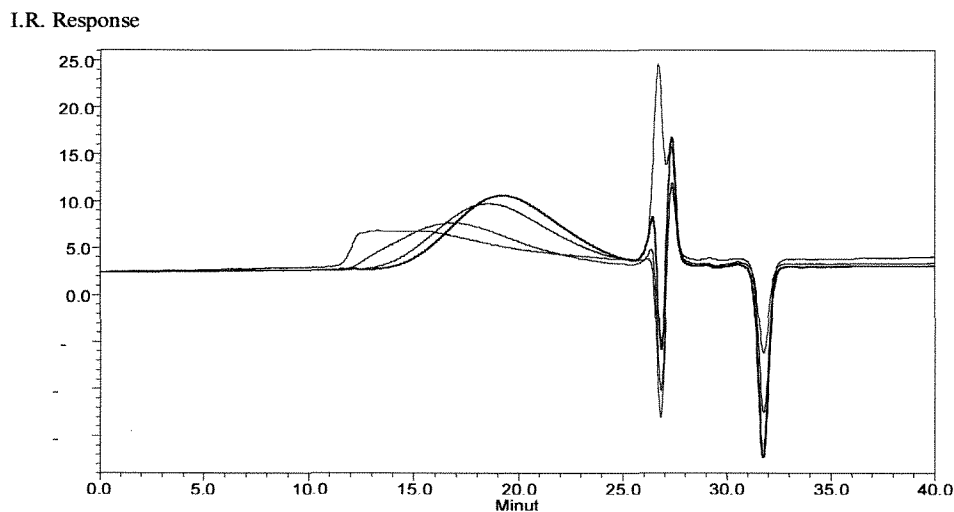


Figure 4 – HPSEC profiles for chitosan (DD 0.8) at various times of treatment with immobilised papain at pH 3.2 and 50°C.

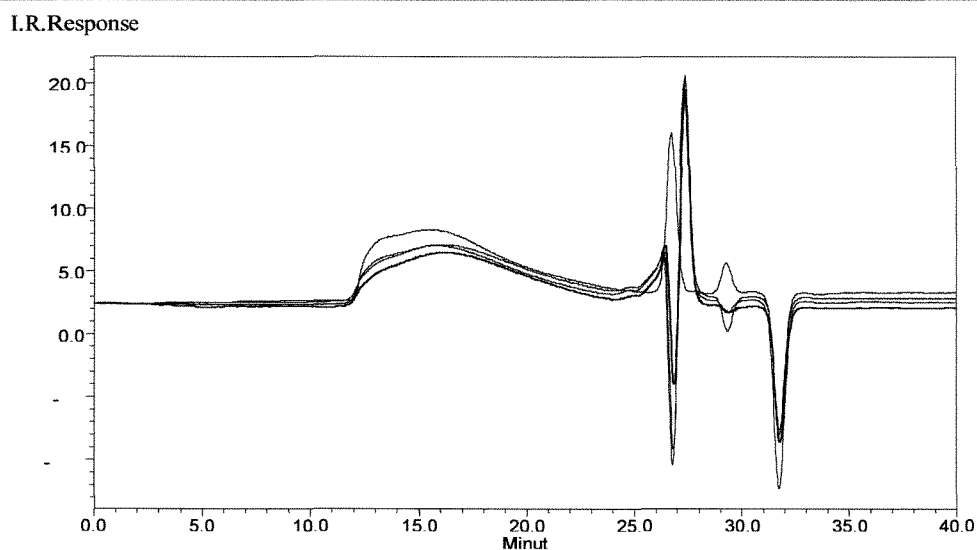


Figure 5 – HPSEC profiles for chitosan (DD 0,8) at various times of treatment with free papain at pH 3.2 and 50°C.

GPC parameters for these results are shown in Tables 1 and 2.

Table 1 – Gel Permeation Chromatography of Chitosan treated with papain. Molecular parameters of generated polymers.

Sample	Mw	Mn	Mz	Mz+1
<b>Chitosan</b>	<b>659373</b>	<b>68303</b>	<b>1067412</b>	<b>1321267</b>
<i>Immobilized enzyme assays</i>				
2h	492065	68018	869043	1143315
4h	448834	53533	800158	1064611
24 h	265743	47064	490184	681159
48 h	200167	28717	390295	565555
<i>Free enzyme assays</i>				
0 h	604668	143015	1002496	1267955
2 h	516872	36264	958145	1235369
4 h	496382	33891	934931	1215079
<i>Control solutions (enzyme absent)</i>				
2 h	644188	50205	1055745	1310705
4 h	646098	72611	1044816	1299781
24 h	581761	89049	963918	1223131
48 h	493321	45541	865249	1126887

\* Data obtained by gel permeation chromatography using Millenium 32 software, with dextran standards as molar mass calibration parameters.



Table 3 – Gel Permeation Chromatography of Chitosan treated with papain. Cumulative distribution of molar mass (MM) fractions\* Data obtained by gel permeation chromatography using Millenium 32 software, with dextran standards as molar mass calibration parameters.

Sample	% MM above $10^6$ g mol <sup>-1</sup>	% MM between $10^6$ and $4 \times 10^5$ g mol <sup>-1</sup>	% MM between $4 \times 10^5$ and $10^4$ g mol <sup>-1</sup>	% MM below $10^4$ g mol <sup>-1</sup>
Chitosan	27.0	33.0	34.8	4.0
<i>Immobilized enzyme assays</i>				
2h	13.5	36.1	48.2	4.0
4h	10.0	34.1	62.2	4.0
24 h	1.5	21.3	74.1	4.6
48 h	0.0	14.0	78.7	8.0
<i>Free Enzyme Assays</i>				
0 h	21.5	35.9	40.8	1.0
2 h	17.0	35.0	42.6	6.5
4 h	16.0	33.0	44.9	7.0
<i>Control solutions (enzyme absent)</i>				
2 h	26.0	33.0	37.4	
4 h	25.0	36.8	36.5	1.5
24 h	19.0	37.8	41.0	2.1
48 h	13.0	36.5	47.0	4.5

Although the use of indirect calibration can cause significant errors in molar mass determination, it could be used here since the aim of this work is to investigate modifications between papain treated chitosan and the original solution, which is a internal reference. Absolute average molar mass of chitosans has been determined by coupled SEC-LALLS techniques (Beri et al, 1993).

## CONCLUSIONS

The immobilization process for papain on solid chitin affected the pore area distribution of the support. It decreased the amount of pores larger than 10 nm.

Chitosan lactate solutions are modified by immobilised papain, which acts preferably on the longest chains of the molecule, providing low molar mass polymers with narrower molar mass distribution after 48 h reaction at pH 3,2 and 50°C. Free papain seems to have no influence in high molar mass chains after 4 h reaction at the same conditions,

---

according to the data provided by HPSEC technique.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia) for the financial support.

### REFERENCES

- Chen, R. H., Hwa, H-D. *Carbohydrate Polymers*, 29 (1996), 353-358.
- Muzzarelli, R. A. A.; Tomasetti, M.; Ilari, M. *Enzyme and microbial technology*, 16 (1994), 110-114.
- Finley, J.W.; Stanley, W.L., Watters, G.G. *Biotechnology and Bioengineering*, 19 (1977), 1895- 1897.
- Beri, R.G., Walker, J., Reese, E. T., Rollings, J. E. *Carbohydrate Research*, 238 (1993), 11-26.
- Sedmak, J.J.; Grossberg, S E. *Analytical Biochemistry*, 79 (1977), 544-552.
- Arnon, R. *Methods of Enzymology*, vol. XIX (1970): 226-244.

## Anexo 10.2 – Curva de calibração – padrões de dextrana

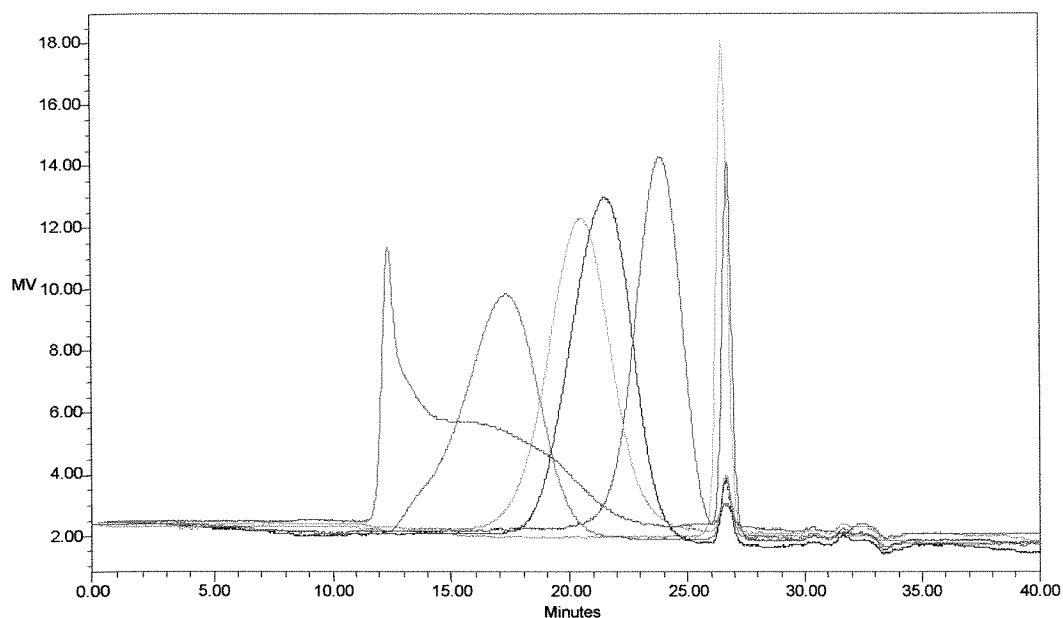


Figura 10.1 – Perfil dos padrões de dextrana (—)  $2 \times 10^6$ , (—) 473000, (—) 65282, (—) 38800, (—) 9400 e (—) D-glucosamina, concentração 2,5 mg/ml. Colunas Ultrahydrogel 1000 e 500 (Waters), fase móvel AcOH 0,33M/NaOH 0,1M, fluxo 0,8 ml/min. Temperatura das colunas: 40°C. Detector índice de refração.

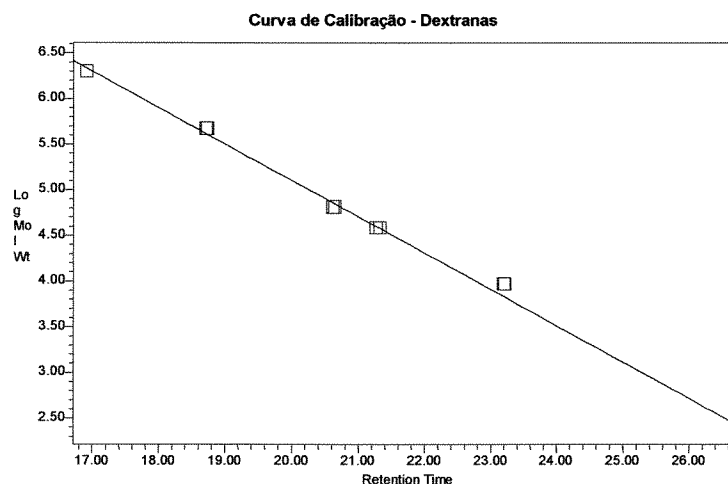


Figura 10.2 - Curva de calibração de dextranas. Ajuste linear ( $\log PM = -3,96 \times 10^{-1} (Tr) + 1,31 \times 10^{-1}$ ). Coeficiente de correlação= 0,9957.